

# Kurz- und Langzeiteffekte ionisierender Strahlung auf die T- Zelllinie Jurkat



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

M.Sc. Biologie Sebastian Fuck

aus Idar-Oberstein

1. Referent: Prof. Dr. Gerhard Thiel
2. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube

Tag der Einreichung: 09.06.2017  
Tag der mündlichen Prüfung: 11.08.2017

Darmstadt 2017

D17

---

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung:**

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zur Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 12.06.2017

---

Sebastian Fuck

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Ehrenwörtliche Erklärung:</b> .....	I
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	II
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	V
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	8
1 Einleitung .....	10
1.1 Allgemeine Einleitung .....	10
1.2 Ionisierende Strahlung .....	11
1.2.1 DNA Reparatur .....	12
1.2.2 Zellzyklusarrest .....	14
1.3 Das Immunsystem .....	16
1.3.1 Angeborenes Immunsystem .....	17
1.3.2 Adaptives Immunsystem .....	19
1.3.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf das Immunsystem .....	21
1.3.4 Jurkat Zellen .....	22
1.4 Zytoplasmatische Signalkaskaden infolge ionisierender Strahlung .....	23
1.4.1 ROS .....	24
1.4.2 Calcium .....	26
1.5 Zielsetzung .....	31
2 Material und Methoden .....	33
2.1 Lösungen .....	33
2.2 Chemikalien .....	34
2.3 Zellen .....	34
2.4 Bestrahlung der Zellen .....	35
2.5 Automatischer Mikroskopischer Zellzähler (EVE <sup>TM</sup> ) .....	35
2.6 Durchmesservergrößerung .....	36
2.7 Auftragen von Deckschichten auf Deckgläser .....	37

2.8	Bestimmung der 3D Zellform .....	38
2.9	Lebendzellmikroskopie .....	38
2.9.1	Calcium Fluoreszenzmikroskopie.....	38
2.9.2	HyPer Fluoreszenzmikroskopie.....	39
2.10	Immunfluoreszenzfärbung/ Foci Analyse .....	39
2.11	Datenverarbeitung.....	40
2.12	Western Blot.....	40
2.13	Zellzyklusanalyse durch Durchflusszytometrie (FACS) .....	41
2.14	Statistische Analyse .....	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Einfluss ionisierender Strahlung auf die Morphologie von Jurkat Zellen .....	43
3.2	Nachweis von Schlüsselproteinen der Immunreaktion in Jurkat Zellen nach Bestrahlung .....	47
3.3	Beeinflussung der strahleninduzierten Vergrößerung .....	53
3.4	Auswirkung ionisierender Strahlung auf zytosolische Signalkaskaden.....	56
3.4.1	Oberflächenbeschichtung von Deckgläsern .....	57
3.4.2	Reaktive Sauerstoffspezies nach Röntgenstrahlung.....	59
3.4.2.1	Die intrazelluläre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Konzentration steigt durch Röntgenstrahlung an ..	60
3.4.3	Auswirkung von extern appliziertem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> auf die [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> .....	64
3.4.4	Auswirkungen IR auf die [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> .....	68
3.5	Einfluss des G2-Arrest auf die Vergrößerung .....	70
3.6	DNA Reparatur und strahleninduzierte Vergrößerung .....	74
4	Diskussion.....	81
4.1	Signalkaskade über ROS und Calcium in Jurkat Zellen .....	82
4.2	Vergrößerung durch den G2-Zellzyklusarrest .....	89
4.3	Vergrößerung durch DNA-Reparaturproteine .....	90
4.3.1	ATR - mehr als nur DNA-Reparatur?.....	93
4.4	Bedeutung der strahleninduzierten Aktivierung für die Strahlentherapie .....	93
4.5	Mögliche Effekte ionisierender Strahlung auf Naive T-Zellen .....	94
4.6	Ausblick .....	96

---

Curriculum Vitae.....	97
Literaturverzeichnis .....	99
Curriculum Vitae.....	110
Danksagung .....	112

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Zellreaktion auf einen Doppelstrangbruch der DNA .....	13
Abbildung 2: Zellzyklus einer humanen Zelle .....	15
Abbildung 3: Angeborene und adaptive Immunantwort .....	18
Abbildung 4: Konzentrationsabfall zwischen extern appliziertem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und der resultierenden internen Erhöhung der Konzentration .....	25
Abbildung 5: Akteure der Calciumhomöostase und des Calciumsignalling .....	28
Abbildung 6: Calcium in der Immunantwort .....	30
Abbildung 7: EVE Cell Counter Auswertsoftware .....	36
Abbildung 8: Vergrößerung des Zelldurchmessers von Jurkat Zellen 48 h nach Bestrahlung ..	45
Abbildung 9: Expressionslevel typischer Proteine, die eine Aktivierung oder Anergie von T-Lymphozyten anzeigen .....	50
Abbildung 10: Potentielle Signalwege für eine strahleninduzierte Vergrößerung .....	52
Abbildung 11: Mögliche <i>second messenger</i> einer IR induzierten Zellvergrößerung .....	54
Abbildung 12: Exemplarische Anhaftungsmöglichkeiten von Jurkat Zellen .....	58
Abbildung 13: Verlauf des HyPer Ratios nach Röntgenbestrahlung .....	62
Abbildung 14: HyPer Ratioänderung nach Bestrahlung und externer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Zugabe .....	63
Abbildung 15: Beispielhafte Ablauf einer Ca <sup>2+</sup> -Oszillation angezeigt durch den Calciumindikator Fluo-4 .....	65
Abbildung 16: Extern appliziertes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> erhöht die [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> .....	67
Abbildung 17: [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub> nach Röntgenbestrahlung .....	69
Abbildung 18: Einfluss des G2-Zellzyklusarrests auf die Durchmessergrößerung .....	72
Abbildung 19: DSBs verursachen Zelldurchmessergrößerung in Jurkat Zellen .....	75
Abbildung 20: 53BP1 Foci in Jurkat Zellen .....	77
Abbildung 21: Einfluss der Inhibition von DNA Reparaturproteinen auf die Proliferation und die strahleninduzierte Vergrößerung .....	79
Abbildung 22: Schematischer Ablauf der Aktivierungs- und Vergrößerungssignalkaskaden ...	92

---

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein 1
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	<i>ATM- and RAD3 related</i>
BAPTA-AM	<i>(1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester))</i>
BCR	<i>B cell receptor</i>
BCIP	<i>(5-blue-4-chloro-3-indolyl-phosphate-p-toluidine)</i>
°C	Grad Celsius
Ca <sub>v</sub>	<i>voltage gated calcium selective channels</i>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>cyt</sub>	Die zytosolische Calciumkonzentration
CD25	$\alpha$ Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CICR	<i>calcium induced calcium release</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CRAC	<i>calcium release-activated calcium release channel</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerol
DCF	<i>Dichlorofluorescein</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IL-2	Interleukin-2
IP	<i>Immunoprecipitation</i> (Immunpräzipitation)

---

IP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4, 5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1, 4, 5-trisphosphat Rezeptor
k <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kV	Kilovolt
LaCl <sub>3</sub>	Lanthan Chlorid
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (reduzierte Form)
NCS	Neocarzinostatin
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PARP	<i>Poly ADP Ribose Polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	<i>plasma membrane calcium ATPase</i>
RNF-128	E3 Ubiquitin-protein Ligase RNF-128; GRAIL
μl	Microliter
μM	Mircomolar
NBT	Nitroblautetrazolium
%	Prozent
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RYR	Ryanodin Rezeptor
s	Sekunde
SERCA	<i>Sarcoplasmic/ endoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup> ATPase</i>
SI-Einheit	frz. <i>Système international d'unités</i>
SOCE	<i>store operated Ca<sup>2+</sup> entry</i>
SOD	Superoxiddismutase

---



---

SSB	<i>Single-strand break</i> (Einzelstrangbruch)
STIM	<i>stromal interacting molecule</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TUD	Technische Universität Darmstadt
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
VOCC	voltage gated calcium channel
YC3.60	<i>yellow cameleon 3.60</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

---

## Zusammenfassung

---

Die schädigende Wirkung ionisierender Strahlung auf humane Zellen ist seit Jahrzehnten bekannt und wird besonders in der Strahlentherapie genutzt um gezielt Tumore abzutöten. Neben der gezielten Bestrahlung des Tumorgewebes wird auch immer gesundes Gewebe bestrahlt. Die Auswirkungen dieser subletalen Dosen sind weniger gut erforscht. Die Strahlenhormesis beschreibt Prozesse bei denen geringe Strahlendosen sogar positive Effekte auf Zellen haben können. Besonders Immunzellen scheinen durch die Strahlung angeregt zu werden, da sie nach einer Bestrahlung Tumorgewebe effizienter bekämpfen können (Liu 2006). Im Zusammenhang mit der Immuntherapie ist die Wirkung der Bestrahlung auf Immunzellen von fundamentaler Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird eine strahleninduzierte Veränderung des Aktivierungszustands der Leukämie T-Zelllinie Jurkat mit den zugrundeliegenden Signalkaskaden untersucht. Eine Bestrahlung von Jurkat Zellen führt zu einer deutlichen morphologischen Änderung und einem veränderten Expressionslevel eines Markers, der für die Aktivierung von T-Zellen charakteristisch ist. In Abhängigkeit von der Dosis vergrößert sich der Zelldurchmesser 48 h nach Bestrahlung. Die Expression von Interleukin-2, einem Zytokin, das bei der normalen Immunantwort infolge einer Aktivierung exprimiert wird, wird hochreguliert. Strahlung bewirkt keine Veränderung der Expression von RNF-128, einem Protein, das T-Zellen exprimieren, wenn sie in den inaktiven Zustand der Anergie wechseln. Obwohl Interleukin-2 hochreguliert wird, konnte keine Zunahme der CD25 Expression nach Bestrahlung beobachtet werden. CD25 wird nur nach einer vollständigen Aktivierung durch Antigen und Costimulus produziert. Die Vermutung, dass eine Signalkaskade über ROS und Calcium, die in vorausgehenden Arbeiten beschrieben wurde, für diese Aktivierung verantwortlich ist, konnte nicht vollends als Ursache bestätigt werden. Mit dem genetisch kodierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Sensor HyPer konnte mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung das ROS Level in Jurkat Zellen erhöht, wobei die Zellen jedoch einen sehr großen Bereich an  $\text{H}_2\text{O}_2$  Änderungen zeigten. Wenn ein Anstieg an  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch in den Zellen durch extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgeahmt wurde, erhöhte sich die intrazelluläre Calciumkonzentration in einer charakteristischen oszillierenden Art und Weise, die auf einen Calcium induzierte Calcium Freisetzung als Signalantwort schließen lässt. In direkten Messungen der Calciumkonzentration in bestrahlten Jurkat Zellen war es jedoch nicht möglich mit dem chemischen Calciumsensor Fluo-4 eine direkte Auswirkung der Strahlung auf die intrazelluläre Calciumkonzentration innerhalb von wenigen Minuten nach

---

Bestrahlung nachzuweisen. Während diese Daten andeuten, dass Calcium keine Rolle in der frühen Reaktion von Zellen auf Strahlung spielt, so zeigen anderen Daten, dass dieser second messenger in späteren Reaktionen beteiligt ist. Mit dem Calciumchelator war es möglich eine strahleninduzierte Vergrößerung der Jurkat Zellen gänzlich zu verhindern. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass eine verzögerte Auswirkung des Calciums eine Rolle in dem Prozess der Zellvergrößerung hat. Ein Abfangen der nach Strahlung entstandenen ROS durch ROS *scavenger* hatte keinen Effekt auf die Vergrößerung. Eine Rolle der ROS für eine Aktivierung konnte ungeachtet dessen durch eine 10 minütige Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gezeigt werden; in dem Fall ersetzt eine kurze Inkubation der Zellen in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Strahlenexposition. Die Versuche zeigen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer konzentrationsabhängigen Vergrößerung der Zellen führt, die in ihrem Maximum halb so stark wie die maximale Vergrößerung nach einer Bestrahlung war. Eine Vergrößerung in gleichem Maße wie nach einer Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte durch den G2-Zellzyklus Inhibitor RO3306 erreicht werden. Zusammen führen diese Daten zur Hypothese, dass 50 % der Vergrößerung der Jurkat Zellen nach Bestrahlung auf eine Signalkaskade über ROS zustande kommen und die übrigen 50 % aus einem G2-Zellzyklussarrest resultieren. In Kontrollversuchen hatte sich gezeigt, dass die entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung keinen Einfluss auf einen G2-Zellzyklussarrest haben. Für die Aktivierung von Jurkat Zellen kommt hingegen eine Signalkaskade infrage, die auch durch ROS induzierbar ist, da kein Zusammenhang zwischen einem G2-Arrest und einer veränderten Transkription oder Aktivierung von T-Zellen bekannt ist.

Proteine der DNA Reparatur gehören zu den Proteinen, die unmittelbar auf die Bestrahlung reagieren können. Sie sind nicht nur in der Lage DNA-Schäden zu reparieren, sondern können überdies Zellen im Zellzyklus arretieren. Proteine der DNA Reparatur wurden als Auslöser der Aktivierung und Vergrößerung vermutet. Daher wurden DSB Reparaturproteine durch Inhibitoren inaktiviert. Die Inhibition des Reparaturproteins ATR hatten nicht nur zur Folge, dass die strahleninduzierte Vergrößerung verhindert wurde, sondern auch die Arretierung im Zellzyklus teilweise aufgehoben wurde. Letzteres äußerte sich dadurch, dass Jurkat Zellen selbst nach einer Strahlendosis, die ausreicht um einen kompletten Zellzyklussarrest zu initiieren, weiter proliferierten. Dies führt zur Hypothese, dass ionisierende Strahlung durch direkte und indirekte Effekte einzelsträngige Bereiche der DNA erzeugt, wodurch ATR rekrutiert wird, das einerseits einen Zellzyklussarrest initiiert und andererseits eine Vergrößerung und Aktivierung der Jurkat Zellen über zytosolische Signalmoleküle bewirkt. Die Bedeutung des Reparaturproteins ATR für das Zellschicksal ist folglich größer als bisher

---

angenommen. ATR könnte daher das zentrale Protein sein, das für positive Effekte im Zuge der Strahlenhormesis sorgt.

---

## Abstract

---

The damaging effects of ionizing radiation on human cells are well known for years and this knowledge is extensively used in the radiation therapy to treat tumors. In addition to the selective irradiation of tumor tissue the surrounding healthy tissue is also affected by the radiation. The effects of these sublethal doses are poorly understood. Radiation hormesis is described as an positive effect of small radiation doses for cells. Especially cells of the immune system seem to be stimulated by the radiation, because their ability to eliminate the tumor tissue is increased after radiation (Liu 2006). In the context of immune therapy it is of tremendous interest to understand the effect of radiation on immune cells.

Radiation induced stimulation and activation of the human leukemic T-cell line Jurkat and the underlying signaling cascades are investigated in this study. The radiation of Jurkat cells leads to an obvious morphological change and influences the expression of typical markers for the immune activation of t-cells. 48 h after irradiation the diameter of Jurkat cells increases in a dose-dependent manner. In addition the expression of the cytokin Interleukin-2 (IL-2) is also upregulated. IL-2 is normally expressed due to activation of the t-cells by antigen stimulation. Radiation has no influence on the expression level of RNF-128. This protein is a typical marker for anergic t-cells and is expressed, if they are insensitive to stimulation. Although an upregulation of IL-2 was detected, the expression of CD25 was not influenced by the radiation. CD25 is only produced by fully activated T-cells, which are stimulated by an antigen and a costimulation. The hypothesis that a signaling cascade via ROS and calcium is induced, which was characterized in a previous work, could not completely be proven. The genetically encoded  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor HyPer showed with a high spatial and temporal resolution that ionizing radiation elevates the level of intracellular ROS, but the magnitude of this elevation varied a lot. If this elevation of the intracellular ROS concentration by radiation was mimicked with externally applied  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  oscillated in a manner, which is characteristic for a process called calcium induced calcium release. Direct measurements of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  with the calcium indicator Fluo-4 did not reveal any change of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  within a few minutes after radiation. While this data is not indicating a role of  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in the early reactions straight after the radiation, other data shows a delayed effect of calcium. The calcium chelator BAPTA-AM diminished a radiation induced diameter increase completely. Scavenging of the radiation induced ROS did not affect the diameter increase at all. Nevertheless ROS seem to be involved in the radiation induced diameter increase, because a short treatment with different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased the diameter of Jurkat cells in

---

a concentration-dependent manner. The maximum of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced diameter increase was only half of the radiation induced effect. The same diameter increase as with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was accomplished with a G2 arrest induced by the CDK1 inhibitor RO3306. Altogether the data leads to the hypothesis that 50 % of the radiation induced diameter increase of Jurkat cells is related to a G2-arrest and the other 50 % are related to a ROS mediated signaling cascade. Control experiments did not show any effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment on the G2-arrest. The activation process after ionizing radiation is attributed to the signaling cascade via ROS, because there is no influence of the G2-arrest on the transcription or activation of t cells known.

Proteins of the DNA repair perform the first reaction after ionizing radiation. In addition to their ability to repair damaged DNA segments, they are able to initiate an effective cell cycle arrest. Proteins of the DNA repair are supposed to be the trigger for the activation and the diameter increase. The inhibition of the repair protein ATR did not only prevent the radiation induced diameter increase, but also abrogated the G2-arrest. Jurkat cells treated with the ATR inhibitor were able to proliferate, although they were irradiated with a dose which induces a complete G2-Arrest. This leads to the hypothesis that ionizing radiation generates single-stranded DNA and double-strand breaks via direct and indirect effects, which recruits ATR. ATR initiates on the one hand efficiently a G2-arrest and on the other hand a diameter increase and an activation of Jurkat cells, which is related to a cytosolic signaling cascade. The importance of the DNA repair protein ATR was underestimated for several years. ATR could be the key protein for positive effects of the radiation hormesis

---

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Allgemeine Einleitung

---

Die schädigende Wirkung hoher Dosen ionisierender Strahlung auf humane Zellen ist seit langem wohl bekannt. Aus genau diesem Grund wird sie in der Tumorthherapie zur Abtötung von entarteten Krebszellen eingesetzt. Ziel ist es, dem Tumorgewebe eine hohe und dadurch letale Dosis zu verabreichen und das gesunde umliegende Gewebe vor der Strahlung zu schützen (Tobias et al. 1982; Durante and Loeffler 2010). Die Bestrahlung von gesunden Zellen ist ein unerwünschter, aber geduldeter Nebeneffekt. Denn obwohl das gesunde Gewebe ausgespart wird und einer möglichst geringen Dosis ausgesetzt ist, erhöht laut dem *Linear no-threshold* Modell (LNT) jede noch so kleine Dosis die Gefahr für Sekundärtumore. Das auf den Daten von Atombombenüberlebenden von Hiroshima und Nagasaki beruhende Modell wird nun jedoch in Frage gestellt, da geringe Strahlendosen unter anderem einen positiven Effekt auf Immunzellen zu haben scheinen (Luckey 2006; Doss 2013).

Die Wirkung hoher Strahlendosen auf Zellen ist schon Jahrzehnte Gegenstand der Forschung. Den Auswirkungen geringer Strahlendosen wurde jedoch lange keine Aufmerksamkeit gewidmet. Es ist inzwischen gut dokumentiert, dass der Effekt, den geringe Strahlendosen auf Zellen haben vielseitig und keineswegs vernachlässigbar ist (Feinendegen et al. 2004). Besonders im Zusammenhang mit dem Immunsystem wird Strahlung indes nicht nur eine schädigende Wirkung zugesprochen, sondern auch eine stimulierende Wirkung (Strahlenhormesis) im zugesprochen (Vaiserman 2010; Alavi et al. 2016). Rheuma oder Arthritis Patienten, die an schmerzenden Gelenken leiden, hervorgerufen durch falsche Immunreaktion, berichten über die heilende Wirkung eines Aufenthalts in einem Bergwerk mit erhöhter natürlicher Strahlenexposition durch Radon. Radon ist ein  $\alpha$ -Strahler und wird vom menschlichen Körper überwiegend über die Atemwege aufgenommen. Im Falle von Rheuma und Arthritis wird von Kritikern angemerkt, dass nicht bekannt sei, ob die heilende Wirkung des Aufenthalts auf Radon allein zurückzuführen ist oder auf weitere Gegebenheiten des Bergwerks wie eine hohe Luftfeuchtigkeit oder die erhöhte Temperatur (Shehata et al. 2006; Moder et al. 2010). Eine stimulierende Wirkung ionisierender Strahlung wird ebenfalls im Zusammenhang mit der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) berichtet. Ionisierende Strahlung regt Antigenpräsentierende Zellen dazu an, vermehrt Antigene an ihrer Oberfläche zu präsentieren, wodurch naive Immunzellen zur Proliferation angeregt werden (Huang et al. 2011). Diese Effekte zeigen, dass ionisierende Strahlung abhängig von

---

der Dosis, der Dosisrate und dem Zelltyp nicht zwingend schädigend sein muss, sondern sogar eine heilende Wirkung haben kann.

---

## 1.2 Ionisierende Strahlung

---

Als Ionisation wird das Herauslösen von Elektronen aus der Hülle von Atomen oder Molekülen bezeichnet. Findet eine Ionisation statt, wird die Eigenschaft des ionisierten Materials geändert, meist durch das Aufbrechen von Bindungen zwischen Molekülen. Ionisierende Strahlung ist aufgrund ihrer im Vergleich zu sichtbarem Licht hohen kinetischen Energie in der Lage Materie zu ionisieren. Man unterscheidet bei ionisierender Strahlung zwischen elektromagnetischer Wellen- (Photonen) und Teilchenstrahlung. Zur Teilchenstrahlung zählen neben den geladenen Teilchen wie  $\alpha$ - (Heliumkerne),  $\beta$ -Teilchen (Elektronen, Positronen), Protonen und Schwerionen auch ungeladene Neutronen.  $\alpha$ -Strahlung, Protonen, Neutronen und Schwerionen werden als dicht ionisierend bezeichnet, da die Energiedeposition in einem räumlich eng begrenzten Bereichen um die Teilchenspur stattfindet. Die als locker ionisierend bekannten Photonen lassen sich in natürlich vorkommende  $\gamma$ -Strahlung, die als Nebenprodukt bei Zerfallsprozessen entsteht, und die künstlich erzeugte Röntgenstrahlung, die durch das abrupte Abbremsen von künstlich beschleunigten Elektronen entsteht, einteilen. Teilchenstrahlung wechselwirkt zumeist direkt mit Materie durch inelastische Stöße. Dahingegen sind für die Wechselwirkung von Photonen mit Materie abhängig von der Energie der Photonen und der atomaren Zusammensetzung des Absorbermaterials drei unterschiedliche physikalische Effekte verantwortlich: der Photoeffekt, der Compton Effekt und der Paarbildungseffekt. Als physikalische Maßeinheit für die pro Masse deponierte Energiedosis wird die nach dem englischen Physiker Louis Harold Gray benannte SI-Einheit Gray (Gy;  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ ) verwendet.

Je nach Strahlenqualität haben die jeweiligen Strahlenarten unterschiedliche biologische Wirksamkeiten, die durch einen Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden. Die Einheit für diese gewichtete Äquivalentdosis ist Sievert (Sv;  $1 \text{ Sv} = 1 \text{ J/kg}$ ). Die jährliche Strahlenexposition wird in Sievert angegeben und setzt sich aus einem natürlichen und einem künstlichen Anteil zusammen. Die jährliche Dosis beträgt in Deutschland im Mittel 4 mSv. Zu 50 % tragen künstliche Strahlenquellen wie z.B. medizinische Anwendungen (Computertomographischen Untersuchungen) zur jährlichen Strahlenbelastung bei, die



---

weiteren 50 % werden von natürlichen Strahlenquellen wie kosmischer Strahlung oder dem Einatmen von Radon beigesteuert. Je nach Region und zusätzlicher künstlicher Strahlenbelastung können diese Werte allerdings stark vom Mittel abweichen.

In dieser Arbeit wird ausschließlich Röntgenstrahlung verwendet. Diese wird in der Krebstherapie seit Jahrzehnten zur Behandlung von Tumoren eingesetzt, die durch eine Bestrahlung abgetötet werden sollen. Die schädigende Wirkung entsteht zum einen durch eine direkte Strahlenschädigung, da Valenzelektronen aus Molekülbindungen gelöst werden und es damit zum Bruch dieser Bindung kommt. Zum anderen kann die Radiolyse von Wassermolekülen zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führen, die wiederum in der Lage sind Zellkomponenten anzugreifen. Veränderungen der DNA als Informationsträger der Zelle gelten als schwerwiegendste Folgen einer Strahlenschädigung. Einer geschädigten Zelle stehen jedoch eine Vielzahl an Reparaturmechanismen zur Verfügung um diese Schäden effizient zu reparieren.

---

### 1.2.1 DNA Reparatur

---

Die Integrität der DNA ist von fundamentaler Bedeutung für das Fortbestehen einer Zelle. Veränderungen der Erbinformation können zu Mutationen und Krebs führen oder bei irreparablen Schäden zum Absterben der Zelle. Die Gewährleistung der Integrität der DNA und die fehlerfreie Weitergabe der Information trotz massiver Schäden der DNA werden durch ein sehr komplexes Zusammenspiel von DNA Reparaturproteinen gewährleistet. Diese Reparaturmaschinerie ist in der Lage eine sehr große Anzahl an Schäden ohne den Verlust von Information zu reparieren, bevor es zur Zellteilung kommt. Dafür gibt es für die meisten Typen von Schäden eigene Reparaturproteine. Während des Zellzyklus entstehen durch Stoffwechselprozesse eine Vielzahl an endogenen DNA Schäden (Lindahl and Barnes 2000). Einzelstrangschäden wie falsche Basenpaare oder der Verlust von Basen sind ebenso Beispiele für Schäden, die für die Zelle einfach zu reparieren sind, wie Einzelstrangbrüche (*single strand breaks* SSBs) (Ward et al. 1985; Christmann et al. 2003; Sancar et al. 2004). Entstehen zwei SSBs in enger räumlicher Nähe auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen, kann dies zu einem Doppelstrangbruch (DSB) führen. Die DSBs zählen zu den folgenreichsten DNA Schäden, die durch ionisierende Strahlung induziert werden (Ward 1995; Khanna and Jackson 2001).

In Abb.1 ist der Ablauf der zellulären Reaktion auf einen DSB schematisch gezeigt. Nachdem ein DSB durch Sensorproteine erkannt wurde, erfolgt die Übermittlung und Modulation der Schadensantwort durch weitere Proteine, bevor die eigentliche Reparatur durch spezielle dafür vorgesehen Proteine durchgeführt wird (Petrini and Stracker 2003). Störungen in der Kommunikation dieses Reparaturnetzwerks können zu schwerwiegenden Krankheiten wie dem Louis-Bar-Syndrom (Ataxia telangiectasia) und einer erhöhten Strahlensensitivität führen (Lavin 2008).

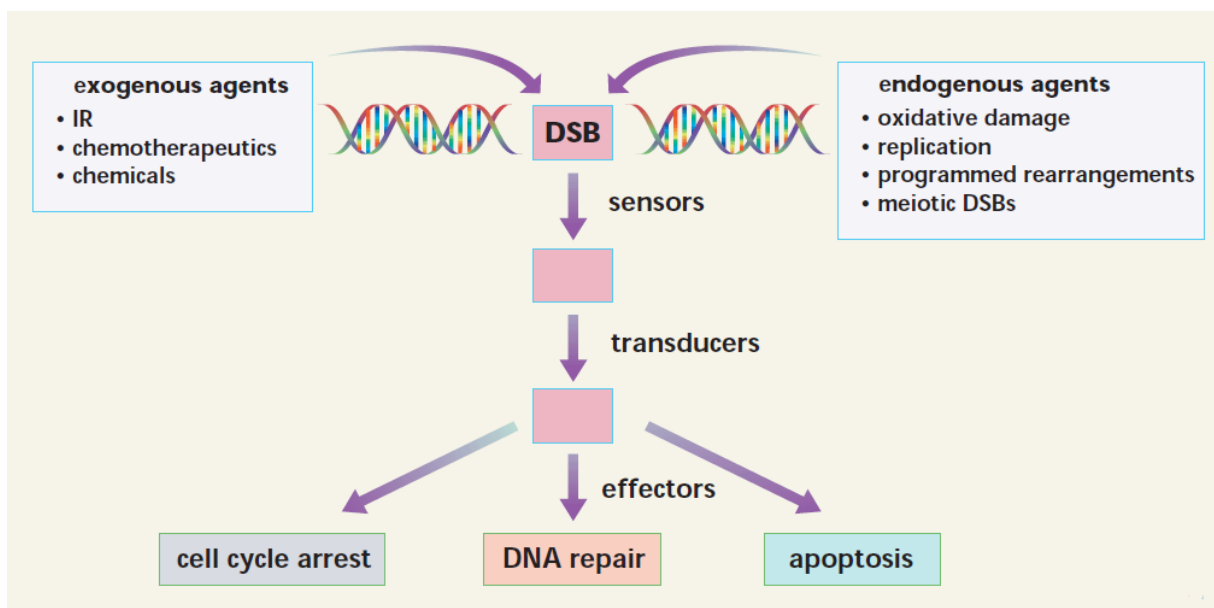


Abbildung 1: Allgemeine Zellreaktion auf einen Doppelstrangbruch der DNA

Ein durch exogene oder endogene Einflüsse erzeugter DSB wird durch Sensorproteine erkannt. Die Schadensantwort wird an Effektorproteine übertragen und gleichzeitig moduliert. Die Zelle kann als Reaktion auf den DSB mit einem Zellzyklusarrest, der Reparatur des Schadens oder bei zu schwerwiegenden Schäden mit der Apoptose reagieren. (entnommen aus Khanna & Jackson 2001)

Zur Reparatur eines DSBs stehen abhängig von der Komplexität des Bruches und der Zellzyklusphase mehrere Reparaturwege bereit. Die zwei Hauptreparaturwege für DSBs sind das *non-homologous end joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (van Gent et al. 2001; Mao et al. 2008). Während das NHEJ unabhängig vom Zellzyklus jederzeit Schäden reparieren kann, ist die HR bei der Reparatur auf das Schwesterchromatid angewiesen und kann somit nur Schäden in der G2-Phase beheben (Rothkamm et al. 2003). Das NHEJ gilt allerdings als fehleranfällig, da es den Bruch nur legiert, ohne das Fehlen von Basenpaaren zu prüfen. Die HR wird als weitestgehend fehlerfrei beschrieben, da sie das Schwesterchromatid

---

als Vorlage bei der Reparatur verwendet (Khanna and Jackson 2001; Kinner et al. 2008). Eine fehlerhafte oder unzureichende Reparatur der DSBs kann zur Apoptose führen, wodurch die Gefahr der Zellentartung reduziert wird (Hoeijmakers 2001; d'Adda di Fagagna 2008). Um zusätzliche Zeit für die Reparatur zu generieren, können Zellzyklusarreste initiiert werden. Die Zelle verharrt solange in diesen Aresten bis nur noch eine tolerierbare Anzahl an Schäden vorliegt.

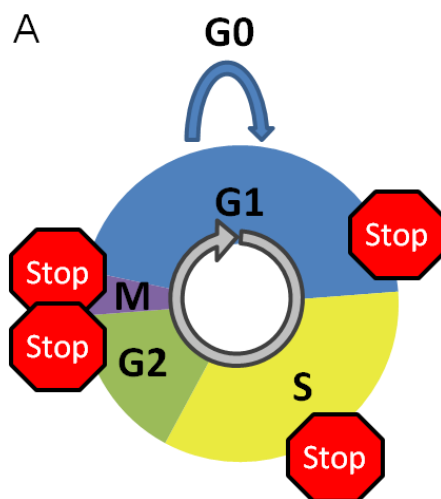
---

### 1.2.2 Zellzyklusarrest

---

In mehrzelligen Organismen muss eine ständige Vermehrung an Zellen stattfinden um das Absterben von Zellen zu kompensieren oder Wachstum zu ermöglichen. Eukaryotische Zellen durchlaufen hierfür einen fein abgestimmten Kreislauf, den Zellzyklus. Der Zellzyklus, den eine Zelle vor einer Teilung in zwei neuen Tochterzellen durchläuft, umfasst vier Hauptphasen: Die G1-Phase, die S-Phase, die G2-Phase (G= *gap* (Lücke); S = Synthese) und die Mitose. In der G1-Phase haben die Zellen zusätzlich die Möglichkeit auf äußere Gegebenheiten wie zum Beispiel Nährstoffmangel zu reagieren und in eine Ruhephase (G0-Phase) einzutreten. Aus dieser können sie bei geänderten Gegebenheiten auch wieder in den normalen Zellzyklus zurückkehren.

In der G1-Phase wächst die Zelle durch die Synthese von Proteinen und bildet vermehrt Zellorganellen, die in der S-Phase (Synthese) zur Verdopplung des DNA Gehalts notwendig sind, sodass nach der S-Phase jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht. In der G2-Phase generiert die Zelle weiter Proteine, die für die folgende Zellteilung von Nöten sind und repariert Schäden der DNA, die während der Replikation entstanden sind. In der Mitose werden die Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen aufgeteilt und die Zelle teilt sich, wodurch der Zellzyklus einmal erfolgreich durchlaufen wurde. Die ungefähre Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen ist in Abb.2 dargestellt.



B

Zellzyklusphase	ungefähre Dauer [h]	Aufgabe
G1	6,5-10	Wachstum
S	8-10	Replikation der DNA
G2	1,5-3,5	schnelles Wachstum
M	1	Zellteilung

Abbildung 2: Zellzyklus einer humanen Zelle

A) Es sind die Zellzyklusabschnitte mit den möglichen Zellzyklusarresten dargestellt. Der Zellzyklus verläuft von der G1- über die S- und G2-Phase bis hin zur Mitose in der sich die Zelle in zwei Tochterzellen teilt. Die G0-Phase stellt eine Sonderphase der G1-Phase dar, in der die Zelle nicht proliferiert. B) Ungefähre Verweilzeiten in den jeweiligen Zellzyklusphasen (entnommen aus Hahn et al. 2009) sowie den in denselben zu bewältigende Aufgaben.

Der Ablauf der einzelnen Zellzyklusphasen wird durch eine Vielzahl von Proteinen in jeder Phase überprüft um eine korrekte Replikation des Genoms zu sichern. Bei einer fehlerhaften Zellteilung droht die Zelle abzusterben oder zu entarten. An sogenannten *Checkpoints* wird überprüft, ob der Zelle für die jeweilige Zellzyklusphase genügend Zeit zur Verfügung stand und alle nötigen Prozesse erfolgreich abgelaufen sind. Ist dies nicht der Fall oder wird die Zelle durch exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung geschädigt, können nach der G1- und der G2-Phase, während der S-Phase und vor der Mitose Zellzyklusarreste eingerichtet werden. In diesen verharrt die Zelle bis die Bedingungen für eine Progression im Zellzyklus erfüllt sind (Murray 1994; Barnum and O'Connell 2014). Eine Zelle wird aus dem jeweiligen Checkpoint entlassen, wenn zellzyklusspezifische Cycline an cyclinabhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases* = CDK) binden und diese aktivieren. Die Aktivität der CDKs steuert den Zellzyklus und veranlasst die Zelle zu progressieren (Nigg 1995; Graña and Reddy 1995).

Dem nach Strahlenschäden initiierte G2-Arrest wird in dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommen. Ein G2-Arrest kann durch verschiedene Faktoren aktiviert werden. Die Reparaturkinasen *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *ATM and RAD3-related* (ATR) werden als Reparaturkinasen zum Schadenort rekrutiert. Dabei sensiert ATM DSB und ATR

---

einzelsträngige, bereits resektierte DNA-Bereiche. Diese Kinasen starten eine Signalkaskade an deren Ende der Cyclin/CDK Komplex inaktiv bleibt (Abraham 2001; Iliakis et al. 2003; Shibata and Jeggo 2014). ATM und ATR sind für die Initiierung des Checkpoints zuständig. Für das Aufrechterhalten des Checkpoints sind weitere Proteine verantwortlich. Eine wichtige Rolle kommt unter anderem dem Tumorsuppressor p53 zu (Di Leonardo et al. 1994; Bunz et al. 1998). Der G2-Arrest kann aufgehoben werden, selbst wenn noch nicht alle Schäden repariert sind. Zellen durchlaufen die Mitose und teilen sich, obwohl 10-20 DSBs nicht repariert sind (Deckbar et al. 2007).

Anhand des Zellzyklusarrests und der DNA Reparatur wird deutlich welche weitreichenden Proteinnetzwerke durch ionisierende Strahlung beeinflusst werden. In dieser Arbeit wird der Einfluss von Röntgenstrahlen auf Zellen des Immunsystems untersucht, weshalb dieses im Nachfolgenden genauer charakterisiert wird.

---

### 1.3 Das Immunsystem

---

Der menschliche Organismus ist ständig dem Angriff von Pathogenen ausgesetzt, die ihm Schaden zufügen können. Der Körper ist den Eindringlingen keineswegs hilflos ausgesetzt, sondern verfügt über effektive Abwehrmechanismen, um diesen Pathogenen entgegenzuwirken. Das Immunsystem erfüllt die Rolle des Verteidigungssystems und hat dazu spezielle Fähigkeiten um die Abwehr einzuleiten. Da sich Krankheitserreger ständig verändern, ist es in der Lage gezielt auf jeden Erreger zu reagieren. Das Immunsystem lässt sich in zwei Komponenten einteilen: die angeborene und die adaptive Immunantwort. Beide Komponenten arbeiten eng zusammen. Die adaptive Immunantwort tritt im Vergleich zur angeborenen verzögert auf, da sie auf die Reaktion des angeborenen Immunsystems angewiesen ist. Eine vollständige Immunreaktion setzt sich aus beiden Komponenten zusammen.

Eine Immunreaktion lässt sich in vier Aufgabenbereiche untergliedern, die zeitlich koordiniert ablaufen (Murphy et al. 2012). Nach einer Infektion durch ein Pathogen muss dieses erst erkannt werden. Erreger unterscheiden sich durch ihre Bestandteile oder Zusammensetzung von zelleigenen Strukturen. Zellen des Immunsystem erkennen mit *pathogen recognition receptors* (PRRs) die *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) als fremdartige

---

Merkmale (Meylan et al. 2006). Als zweite Phase muss die Infektion eingedämmt und bekämpft werden (Chaplin 2010). Zeitgleich mit der zweiten Phase muss auch die dritte Phase stattfinden, die Immunregulation. Diese verhindert eine Überreaktion der Immunzellen und gleichzeitig werden die Zellen des Wirtsorganismus vor dem Angriff des eigenen Immunsystems geschützt (Van Parijs and Abbas 1998). Ist die Selbstregulation fehlerbehaftet kann es zu Autoimmunerkrankungen oder Allergien kommen (Baecher-Allan and Hafler 2006). Als Ergebnis der erfolgreichen Eindämmung und Bekämpfung eines Pathogens speichert das Immunsystem Informationen über dieses Pathogen ab, sodass bei einer erneuten Infektion die Immunantwort effizienter ablaufen kann. Der Prozess der immunologischen Gedächtnisbildung liefert auch die Grundlage für die Immunisierung durch eine Impfung (Ahmed and Gray 1996; Sallusto et al. 2010).

---

### **1.3.1 Angeborenes Immunsystem**

---

Das angeborene Immunsystem ist der erste Verteidigungsmechanismus gegen Pathogene, nachdem diese durch eine der Epithelien in den Körper eingedrungen sind. Die Reaktion des angeborenen Immunsystems erfolgt schnell und effizient. Die meisten Erreger werden abgetötet bevor das adaptive Immunsystem aktiviert wird oder der Organismus Krankheitssymptome empfindet. Die durch das Genom vorgegebene Ausstattung mit Proteinen und Rezeptoren ermöglicht diese schnelle Reaktion gegen eine Vielzahl von Pathogenen (Janeway and Medzhitov 2002). Trotzdem ist das angeborene Immunsystem in der Lage zwischen Wirt und Erreger zu unterscheiden. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex* MHC) umfasst einige Gene, die für Oberflächenproteine kodieren und über die jede körpereigene Zelle verfügt. An der Zelloberfläche werden verdaute zelleigene Proteine oder zellfremde Proteine durch den MHC präsentiert. Jede kernhaltige Zelle eines Organismus besitzt MHC der Klasse I, der Immunzellen zur Differenzierung zwischen gesunden und infizierten oder entarteten Zellen dient. Der MHC der Klasse II wird hauptsächlich von spezialisierten Antigenpräsentierenden Zellen zur Stimulation von T-Zellen exprimiert (Neefjes et al. 2011).

In der vorgegebenen Ausstattung an Rezeptoren und Proteinen liegt aber auch dessen Nachteil, da geringfügige Unterschiede zwischen Erregern nicht erkannt werden können, wodurch eine spezifische Immunantwort kann daher nur durch das adaptive Immunsystem erfüllt werden kann.

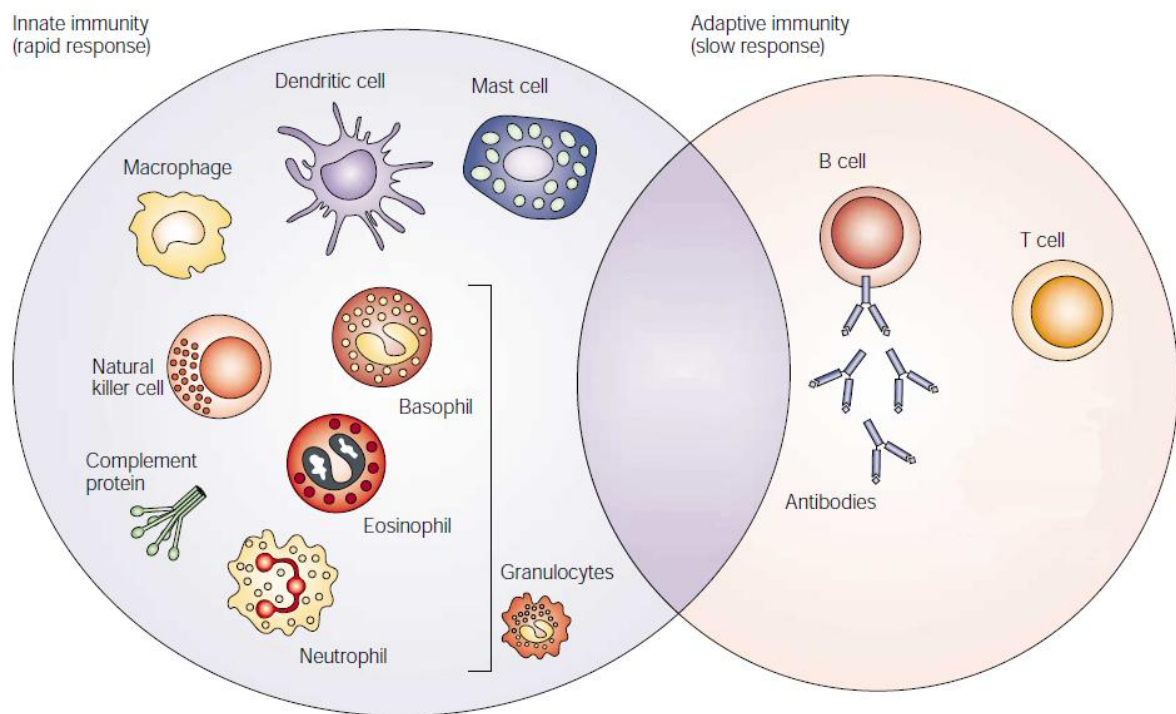


Abbildung 3: Angeborene und adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort reagiert schnell und effizient auf das Eindringen eines Pathogens in den Wirtsorganismus. Zu den Zellen der angeborenen Immunantwort zählen Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und die Granulozyten (basophile, eosinophile und neutrophile). Zusätzlich werden diese Zellen durch freie gelöste Proteine des Komplementsystems unterstützt, die durch Binden eines Erregers diesen direkt zerstören oder weitere Immunzellen stimulieren können. Die adaptive Immunantwort wird von Antikörper sekretierenden B-Zellen und T-Zellen gebildet. Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort erfolgt verzögert nach der angeborenen (entnommen aus Dranoff 2004).

Der Ort der Infektion entscheidet darüber, welche zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems als erste ansprechen. Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten (Eosinophile, Basophile, Neutrophile) und natürliche Killerzellen bilden die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems (Abb.3). Eine besondere Funktion kommt den Dendritischen Zellen zu. Sie verbinden das angeborene mit dem adaptivem Immunsystem

---

indem sie Erreger phagozytieren, verarbeiten und ihre Bestandteile an ihrer Oberfläche als Antigene an MHC II Komplexen präsentieren (Kapsenberg 2003). Aus diesem Grund werden Dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cell* APC) bezeichnet. Zu den APCs zählen neben den dendritischen Zellen auch Makrophagen, Monozyten und B-Lymphozyten. Nachdem die dendritischen Zellen durch die Aufnahme eines Erregers zu APCs gereift sind, wandern sie in die Lymphknoten und aktivieren dort naive T-Lymphozyten, die zur adaptiven Immunantwort gehören (Banchereau and Steinman 1998). Dieser Schritt stellt den Übergang vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem dar und erfolgt, falls die angeborene Immunantwort nicht ausreicht um den Erreger zu bekämpfen.

---

### 1.3.2 Adaptives Immunsystem

---

Die adaptive Immunantwort ist im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort hochspezifisch und nicht nur auf ihre vererbten Merkmale angewiesen, da sie bestimmte DNA Segmente beliebig kombinieren kann. Nach dieser irreversiblen somatischen Rekombination (V(D)J Rekombination) der Gene, die für die Antigenrezeptoren an der Zelloberfläche kodieren, entsteht eine große Anzahl an Rezeptoren (Gellert 2002). Diese Rezeptoren reagieren selektiv auf Antigenstrukturen, wodurch die hohe Spezifität der adaptiven Immunantwort erklärt werden kann. Die Vorläuferzellen der Immunantwort werden im Knochenmark gebildet, müssen aber im Gegensatz zu Zellen der angeborenen Immunantwort reifen. Bei der Reifung wird ausgeschlossen, dass die zufällig generierten Antigenrezeptoren auf zelleigene Strukturen reagieren. Der Ort ihrer Reifung spiegelt sich im Namen der Zellen wieder. Während T-Zellen im Thymus zu T-Lymphozyten reifen, wurde die Entwicklung von B-Zellen zuerst in Vögeln in der bursa fabricii beobachtet (Cooper et al. 1966; Roitt et al. 1969). Im Menschen reifen die B-Zellen bereits am Ort ihrer Entstehung im Knochenmark (Rolink and Melchers 1991).

Sowohl B- als auch T-Lymphozyten differenzieren und proliferieren vor einem Antigenkontakt nicht (Sprent and Tough 1994). In diesem Zustand werden sie als naiv bezeichnet, da sie keine Funktion erfüllen und nur auf eine Aktivierung durch einen Antigenkontakt warten. Erst nach ihrer Aktivierung werden sie aktiv. Die aktivierten Zellen beginnen zu proliferieren und differenzieren sich zu einer Effektorzellen. Alle Zellen, die nach der Aktivierung gebildet werden, sind Klone der Ausgangszelle und besitzen infolgedessen die gleiche Gen und



---

Rezeptorausstattung. B-Zellen können direkt durch Antigene aktiviert werden, die an den B Zellrezeptor (*B cell receptor* = BCR) binden (Harwood and Batista 2008). Aber auch T-Zellen und Dendritische Zellen aktivieren B-Zellen als Resultat einer Antigenpräsentation an den BCR. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu antikörpersezernierenden Plasmazellen (MacLennan and Vinuesa 2002; Shapiro-Shelef and Calame 2005). Die Antikörper sind gezielt gegen das Antigen gerichtet, durch das die B-Zelle zuvor aktiviert wurde (Rajewsky 1996). Die im Blut und in der Lymphe gelösten Antikörper werden als humorale Immunantwort bezeichnet.

Vor einer Aktivierung sind T-Zellen verhältnismäßig klein, da sie nur mit wenigen Zellorganellen ausgestattet sind. In diesem naiven Zustand sind weite Teile des nukleären Chromatins sowie auch der Stoffwechsel inaktiv (Murphy et al. 2012; MacIver et al. 2013). T-Zellen werden nicht durch freie Antigene aktiviert, sondern sind auf APCs angewiesen, die bereits verdaute fremdartige Strukturen über den MHC II Komplex auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dieser Antigen-MHC II Komplex interagiert mit dem T-Zellrezeptor (*T-cell receptor* = TCR). Zu einer vollen Aktivierung benötigt eine T-Zelle zusätzlich zum Kontakt zwischen einem präsentierten Antigen und ihrem TCR noch einen Costimulus, der ebenfalls durch die APC angeboten wird (s. Abb.6) (Chen and Flies 2013). Die alleinige Stimulierung durch den TCR ohne den Costimulus veranlasst die T-Zelle in einen funktionell inaktiven Zustand zu wechseln, indem sie nicht weiter stimulierbar ist. Der Zustand der Anergie schützt vor Reaktionen auf eigenes Gewebe, falls die Selektion im Thymus nicht vollständig erfolgreich verlief (Schwartz 2003).

In Folge der Aktivierung beginnt eine T-Zelle zu proliferieren und an Größe zuzunehmen, da auch ihr Stoffwechsel aktiver wird (Teague et al. 1993; MacIver et al. 2013). Des Weiteren werden Proteine produziert, die als Marker einer Aktivierung dienen. Zu diesen gehören beispielsweise das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) und CD25.

Eine naive T-Zelle kann sich durch die Aktivierung in unterschiedlichen Typen von Effektorzellen differenzieren. Zytotoxische T-Zellen töten mit Pathogenen infizierte Zellen ab. Regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) unterdrücken die Immunantwort anderer Lymphozyten, sodass nur erkranktes und kein gesundes Gewebe angegriffen wird. Die Nachproduktion von Lymphozyten wird ebenfalls von  $T_{Reg}$ -Zellen reguliert. Den T-Helferzellen obliegt die gegenteilige Aufgabe. Sie regulieren die Immunantwort indem sie durch die Ausschüttung von

---

Zytokinen die Produktion von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen beeinflussen oder auch weitere Immunzellen stimulieren können. Für eine langanhaltende Erinnerung an die Reaktion auf ein Pathogen verbleiben T-Gedächtniszellen auch nach der Infektion im Organismus. Bei der Impfung gegen ein spezifisches Pathogen spielen die T-Gedächtniszellen die zentrale Rolle, da sie die Reaktion auf das Pathogen abspeichern und jederzeit wieder initiieren können. T-Helferzellen modulieren die Immunantwort indem sie durch die Ausschüttung von Zytokinen die Produktion von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen beeinflussen oder auch weitere Immunzellen stimulieren können (Parker 1993; Lanzavecchia and Sallusto 2000).

In dieser Arbeit wird die Auswirkung ionisierender Strahlung auf Jurkat Zellen untersucht. Diese Zelllinie gehört zu den T-Zellen und wurde zur Charakterisierung vieler Signalwege in T-Zellen verwendet. Das Immunsystem besteht aus vielen zellulären Bestandteilen, die fein abgestimmt zusammenarbeiten um einen Erreger zu bekämpfen. Die Aktivierung unterliegt ebenfalls einer strikten Kontrolle, um die uneingeschränkte Funktion des Immunsystems zu gewährleisten. Unter- oder Fehlfunktionen des Immunsystems können zu schwerwiegenden Erkrankungen führen, da Pathogene nicht mehr eingedämmt werden können oder körpereigenes Gewebe durch die Immunzellen fälschlicherweise attackiert wird. In einer vorausgehenden Arbeit konnte eine Signalkaskade aufgeklärt werden, die nach Bestrahlung das *reactive oxygen species* (ROS) und Calcium Level innerhalb der Zelle verändert (Gibhardt et al. 2015). Beide Signalmoleküle sind bei der Aktivierung von T-Zellen beteiligt, weshalb ein potentieller Effekt der ionisierenden Strahlung auf T-Zellen vermutet wird.

---

### **1.3.3 Wirkung von ionisierender Strahlung auf das Immunsystem**

---

Im Laufe des 20. Jahrhundert wurde der Mensch verstärkt künstlichen Strahlenquellen ausgesetzt, weshalb die Auswirkung ionisierender Strahlung als potentiell schädigendes Agens schon früh Gegenstand der Forschung wurde. Die Effekte auf Zellen des Immunsystems wurden bereits in den 50er Jahren untersucht (Pulverkraft et al. 1953). In den Anfangszeiten wurden bei Untersuchungen zu den Auswirkungen ionisierender Strahlung sehr hohe Dosen eingesetzt, da erst ab hohen Dosen gravierende zelluläre Änderungen wie der Zelltod auftreten, die quantifiziert werden konnten.

---

Die Untersuchung der Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Immunzellen erfuhr in der Vergangenheit gesteigertes Forschungsinteresse. Besonders in der Tumorthherapie sind positive Effekte der Bestrahlung auf das Immunsystem gewünscht, da sie zusätzlich helfen den Tumor abzutöten. Tumorgewebe besitzt die Eigenschaft sich immunsuppressiv auf sein direktes Umfeld auszuwirken. Immunzellen werden in ihrer Funktion eingeschränkt und der Tumor wird nicht als solcher erkannt. In der modernen Strahlentherapie ist es möglich durch immer gezieltere Bestrahlungen das gesunde Gewebe bestmöglich zu schonen. Aber besonders diese geringen Strahlendosen scheinen einen stimulierenden Effekt auf Immunzellen zu haben (Reits et al. 2006) und die immunsuppressive Wirkung eines Tumors aufzuheben. Eine Vielzahl positiver Auswirkungen von geringen Strahlendosen auf das Immunsystem und dem damit verbundenen Eindämmen und Bekämpfen eines Tumors werden in einem kürzlich publizierten Review (Janiak et al. 2017) aufgelistet. Der Einsatz einer durch gezielte Immuntherapie ergänzten Strahlentherapie birgt im Vergleich zu einer reinen oder mit einer Chemotherapie kombinierten Strahlentherapie die Möglichkeit einer noch effektiveren und schonenderen Tumorthherapie.

---

#### **1.3.4 Jurkat Zellen**

---

Zur experimentellen Untersuchung müssen naive Lymphozyten aufwendig aus dem Blut isoliert werden. Da sie nicht proliferieren, bleibt deren Anzahl ohne Stimulierung gering. Als Modellzelllinie zur Charakterisierung von Signalkaskaden in T-Zellen hat sich die Zelllinie Jurkat hervorgetan, die mehrere Vor-, aber auch einige Nachteile gegenüber naiven Lymphozyten besitzt.

Die immortale Zelllinie Jurkat wurde aus dem peripheren Blut eines 14 jährigen Jungen isoliert, der an Leukämie erkrankt war (Schneider et al. 1977). Jurkat Zellen sind eine weitverbreitete Zelllinie, um die Aktivierung von T-Zellen und die zugrundeliegenden Signalkaskaden zu untersuchen. Dies erklärt sich angesichts ihrer Fähigkeit zu proliferieren, demgemäß sind Jurkat Zellen leicht kultivierbar. Aus diesem Grunde unterscheiden sie sich von naiven T-Zellen, denen die Fähigkeit zur Proliferation fehlt. Jurkat Zellen sind nicht zur Untersuchung aller Signalkaskaden von naiven T-Zellen geeignet, da es im Detail zu Abweichungen kommen kann (Astoul et al. 2001). Bedingt durch den entarteten Charakter werden schon in unbehandelten Jurkat Zellen einige Proteine der Immunreaktion konstitutiv überexprimiert oder sind durch Mutationen funktionsuntüchtig. Jurkat Zellen exprimieren

---

zum Beispiel kein funktionelles p53 (Cheng and Haas 1990; Hidayat et al. 2003). Dieser Tumorsuppressor könnte auch daran beteiligt sein, dass Jurkat Zellen nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung keinen effektiven G1-Arrest initiieren können. Ungeachtet dessen können sie Zellen effektiv im G2-Arrest arretieren (Syljuâsen and McBride 1999). Die Unterschiede zwischen naiven T- und Jurkat Zellen spiegelt sich auf Ebene der Genregulation wieder. Dennoch existieren genug Gemeinsamkeiten um Jurkat Zellen als Modelllinie zur Untersuchung der Aktivierung von T-Zellen zu verwenden (Lin et al. 2003; Abraham and Weiss 2004).

Besonders die Eigenschaft das Zytokin IL-2 infolge einer Aktivierung produzieren zu können, zeichnet Jurkat Zellen aus (Abraham and Weiss 2004). IL-2 wird als Marker für eine Aktivierung gesehen (Gillis and Watson 1980). Mittlerweile gibt es viele Abkömmlinge der ursprünglichen Jurkat Zelllinie, die durch Mutationen besondere Eigenschaften zeigen.

---

## 1.4 Zytoplasmatische Signalkaskaden infolge ionisierender Strahlung

---

Die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf den Nukleus wurden schon in den Abschnitten 1.3 und 1.4 beschrieben. Weitere Effekte die ionisierende Strahlung außerhalb des Zellkerns vor allem innerhalb des Zytoplasmas erzeugt, erhalten immer mehr Aufmerksamkeit von Seiten der Forschung. Bislang wurden Strahlung fast ausschließlich negative Effekte auf Zellen zugeschrieben. Wie weiter oben beschrieben kann niedrig dosierte Strahlung aber auch kurative Wirkung haben. Diese bereits beschriebene Strahlenhormesis könnte eine Folge von zytosolischen Signalkaskaden sein, die durch ionisierende Strahlung initiiert werden. In einer vorausgehenden Arbeit (Gibhardt et al. 2015) konnte eine Signalkaskade aufgedeckt werden, die außerhalb des Nukleus abläuft und an der mehrere entscheidende *second messenger* beteiligt sind, die auch bei einer Aktivierung von T-Zellen entscheidend mitwirken.

In der genannten Arbeit wurde herausgefunden, dass ionisierende Strahlung in A549 Zellen eine Signalkaskade auslöst, an deren Ende ein Calcium-abhängiger Kaliumkanal in der Plasmamembran aktiviert wird (Roth et al. 2015; Gibhardt et al. 2015). Direkt nach Bestrahlung erhöht sich das Level an ROS sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Diese Erhöhung an ROS bedingt einen Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ ),

---

wodurch ein calciumsensitiver Kaliumkanal aktiviert wird. Diese Signalkaskade konnte in HEK-Zellen, die diesen Kanal transient exprimieren, als auch in A549 Zellen, die diesen Kanal konstitutiv exprimieren, gezeigt werden. Das Zellschicksal kann durch jede Komponente (ROS; Calcium; Kaliumkanal) dieser Signalkaskade umfassend beeinflusst werden. Besonders ROS und freies Calcium sind als wichtige *second messenger* in der Zelle an der Weiterleitung und Modellierung von Stimuli beteiligt (Berridge 1997; Clapham 2007; Forman et al. 2010a; Mazars et al. 2010). Aber auch Kaliumkanäle sind unter anderem für die Progression im Zellzyklus und die Apoptose mitverantwortlich (Lang et al. 2006) oder beeinflussen die Migration (Girault and Brochiero 2014; Gambade et al. 2016). In dieser Arbeit wird die potentielle Auswirkung der beschriebenen Signalkaskade auf die Immunzelllinie Jurkat untersucht, da es einige Parallelen zwischen der Signalkaskade nach Aktivierung und der strahleninduzierten Signalkaskade gibt. Jurkat Zellen besitzen ebenfalls einen calciumaktivierbaren Kaliumkanal, der nach einer Aktivierung verstärkt exprimiert wird (Ghanshani et al. 2000; Fanger et al. 2001). Das Calciumsignalling nach dem Kontakt zwischen einem Antigen und dem TCR ist von fundamentaler Bedeutung für eine Aktivierung (Imboden et al. 1985; Lewis and Cahalan 1989; Feske 2007).  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eine relativ langlebige Form der ROS, verstärkt als *second messenger* die durch den TCR eingeleiteten Signale und ist vor diesem Hintergrund ebenso bei der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt (Reth 2002). Im Folgenden werden die Eigenschaften und Funktionen der Signalmoleküle ROS und Calcium detaillierter beschrieben.

---

#### 1.4.1 ROS

---

ROS entstehen auf natürliche Weise während des Stoffwechsels einer Zelle in den Mitochondrien und durch enzymatische Reaktionen (Bedard and Krause 2007; Murphy 2009). Zu den ROS zählen unter anderem das Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), Ozon ( $\text{O}^3$ ), Singulett Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) oder das Superoxid Anion ( $\text{O}_2^-$ ) (Lambeth 2004). ROS reagieren innerhalb von Bruchteilen einer Sekunde mit den umliegenden Molekülen. In ihrer langlebigsten Form dem Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sind sie in der Lage bis zu 1 ms zu persistieren (Reth 2002).

Die Funktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Zellen ist sehr komplex und lässt sich vereinfacht als positive Signalwirkung im niedrigen Konzentrationsbereich und als schädigende Wirkung bei höheren Konzentrationen beschreiben.

In Abb.4 ist gezeigt, in welchen Konzentrationen sich  $\text{H}_2\text{O}_2$  positiv auf die Zellfunktionen auswirkt und ab welchen Konzentrationen es schädigend wirkt. Die Angaben können je nach Zelltyp variieren. In geringen Konzentrationen (1- ~100 nM intrazellulär) agiert  $\text{H}_2\text{O}_2$  als *second messenger* (Forman et al. 2010a; Sies 2014; Schieber and Chandel 2014). In höheren Konzentrationen sind ROS hingegen als oxidativer Stress bekannt, der letztendlich zum Zelltod führen kann (Slater et al. 1995). Die Zelle verfügt über mehrere Mechanismen um dem oxidativem Stress entgegen zu wirken. Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase oder die Glutathion Peroxidase verringern aktiv die Konzentration der ROS, während antioxidative Proteine wie Glutathion ROS puffern (Halliwell 1974; Chaudière and Ferrari-Iliou 1999; Forman et al. 2010b; Weydert and Cullen 2010). Die Produktion und der ROS Abbau liegen in einem fein ausbalanciertem Gleichgewicht (Trachootham et al. 2008). Krebszellen produzieren aufgrund ihres erhöhten Stoffwechsels vermehrt ROS (Szatrowski and Nathan 1991).

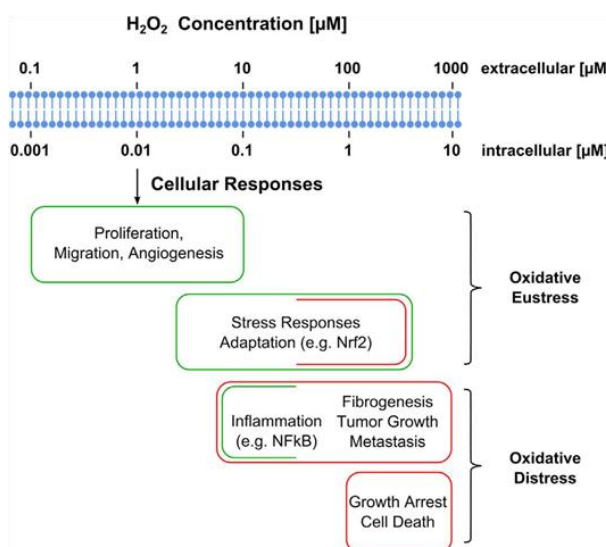


Abbildung 4: Konzentrationsabfall zwischen extern appliziertem  $\text{H}_2\text{O}_2$  und der resultierenden internen Erhöhung der Konzentration

Es werden die Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Leberzellen mit normalem Stoffwechsel berücksichtigt. Ein 100-facher Konzentrationsgradient zwischen externer Umgebung und intrazellulärem Milieu wurde angenommen. Dieser kann je nach Zelltyp variieren. Positive Effekte sind in Grün, schädliche Effekte in rot umrandet (entnommen aus Sies 2017).

---

Eine Bestrahlung mit ionisierender Strahlung führt zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS Konzentration durch die Radiolyse des Wassers. Diese ROS bilden sich nur in einem extrem kleinen Zeitfenster nach Bestrahlung (Pouget and Mather 2001). Mittlerweile wird den ROS, die längerfristig nach einer Bestrahlung entstehen mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Die Mitochondrien oder die NADPH-Oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) produzieren vermehrt ROS über einen längeren Zeitraum nach Bestrahlung (Narayanan et al. 1997; Leach et al. 2001; Collins-Underwood et al. 2008; Yamamori et al. 2012).

Zum Nachweis der unmittelbar nach Bestrahlung entstehenden ROS wurde in dieser Arbeit der genetisch kodierte Sensor HyPer verwendet. Dieser reagiert spezifisch auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  und bietet den Vorteil die Veränderung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration dynamisch und reversibel anzuzeigen. Allerdings reagiert HyPer auf Änderungen des pH-Wertes (Belousov et al. 2006; Lukyanov and Belousov 2014; Gibhardt et al. 2015). Das HyPer Plasmid muss zu einer experimentellen Untersuchung transfiziert werden, darin liegt ein bedeutender Nachteil dieses Sensors, da Jurkat Zellen schlecht zu transfizieren sind. Indes zeigt HyPer relevantere Vorteile gegenüber dem viel verwendeten chemischen ROS Sensor *Dichlorofluorescein* (DCF). DCF ist nicht spezifisch für  $\text{H}_2\text{O}_2$ , generiert bei seiner Anregung zusätzlich ROS und oxidiert irreversibel (Kalyanaraman et al. 2012).

Das intrazelluläre ROS- und Calcium-Level befinden sich in einem gegenseitigen Wechselspiel (Görlach et al. 2015). Extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann calciumleitende Kanäle (*transient receptor potential channel TRP*) aktivieren, die Calcium ins Zytosol leiten (Hecquet et al. 2008). ROS können nicht nur einseitig die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  beeinflussen, sondern die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  hat auch Einfluss auf die ROS Produktion. Eine dauerhaft erhöhte Calciumkonzentration verändert den Stoffwechsel der Mitochondrien, sodass diese vermehrt oder auch reduziert ROS produzieren (Adam-Vizi and Starkov 2010).

---

#### 1.4.2 Calcium

---

Calcium ist ein universeller *second messenger* in humanen Zellen, da dieser bei fast allen zellulären Prozessen und Reaktionen beteiligt ist (Carafoli 2002). Die Calciumhomöostase ist ein fein abgestimmter Prozess, an deren Aufrechterhaltung eine Vielzahl von Proteinen

---

beteiligt ist. Ebenso werden Abweichung von der basalen Calciumkonzentration exakt gesteuert (Berridge et al. 2000). An dieser Stelle werden nur die wichtigsten Signalkaskaden zur Generierung eines Calciumsignals genannt. In der Frequenz, der Amplitude, der Dauer und der Komposition aus diesen drei Komponenten mit dem Ort setzt sich ein Calciumsignal zusammen (Smedler and Uhlén 2014).

Die homöostatische Konzentration an freiem zytosolischem Calcium liegt im nanomolaren Bereich, was einen immensen Konzentrationsunterschied zum umgebenden extrazellulären Raum ( $\sim 2 \text{ mM}$ ) bedeutet (Clapham 1995). Auch in den Ogranellen wie dem Endoplasmatischen Reticulum oder den Mitochondrien ist die Calciumkonzentration ebenfalls deutlich höher als im Zytosol, weshalb diese als interne Speicher für Calcium bezeichnet werden.



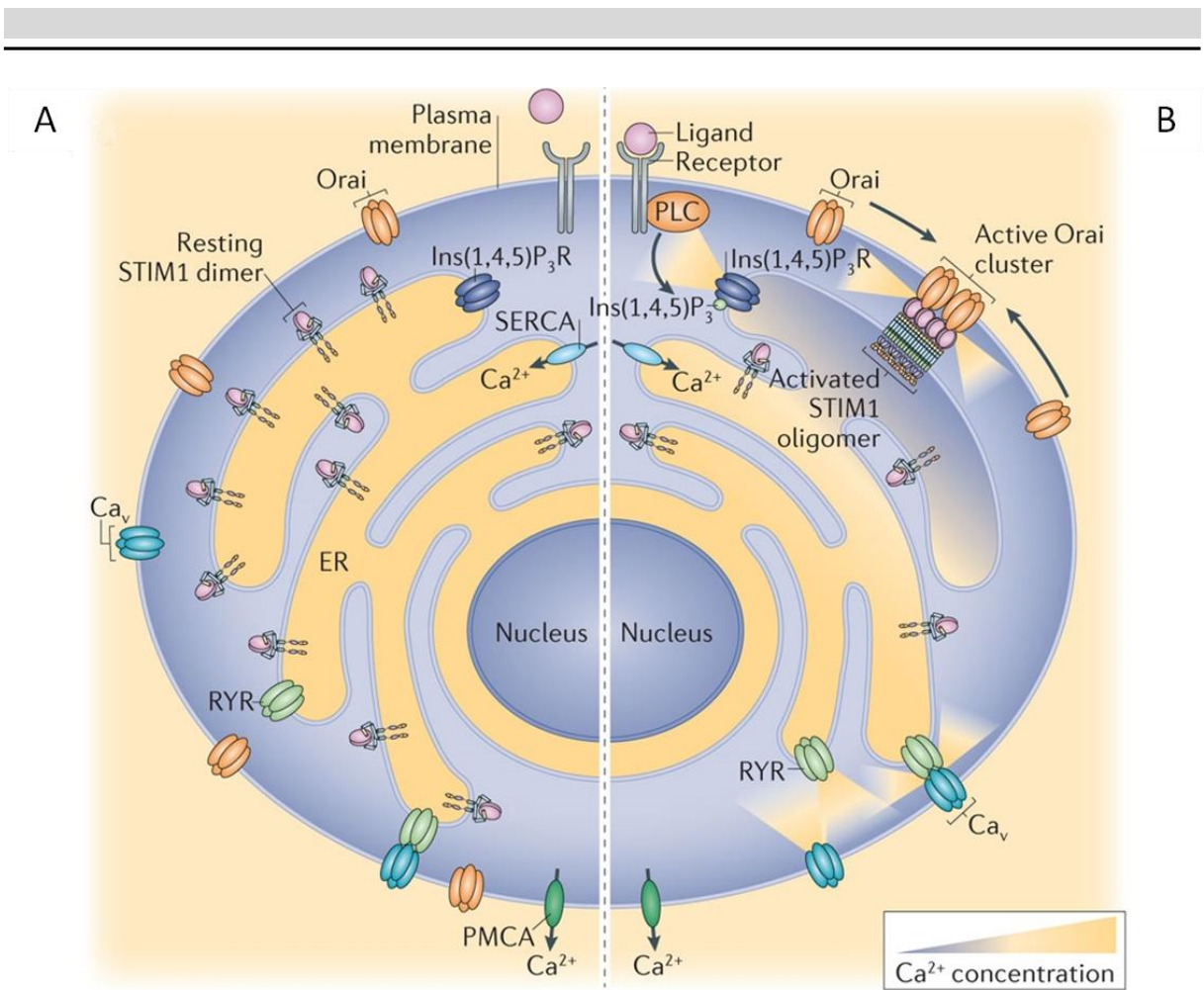


Abbildung 5: Akteure der Calciumhomöostase und des Calciumsignalling

A) Es sind die wichtigsten an der Aufrechterhaltung des nanomolaren basalen Calciumlevels beteiligten Proteine gezeigt. Die Sarko-/Endoplasmatische Calcium ATPase (SERCA) pumpt Calcium aus dem Zytosol ins ER; sowie die Plasmamembran-ständige Calcium ATPase (PMCA) Calcium unter ATP Verbrauch in den extrazellulären Raum pumpt. Es liegt kein Stimulus durch einen Ligand vor B) Erfolgt ein Stimulus durch das Binden eines Liganden an einen Rezeptor, wird die daran gebundene Phospholipase C (PLC) aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) in die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP<sub>3</sub> diffundiert zu IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (IP<sub>3</sub>R) in der ER Membran, was zur Folge hat, dass Calcium aus dem ER durch den IP<sub>3</sub>-Rezeptor ins Zytosol strömt. Nachdem das ER an Calcium entleert wurde, lagern sich *stromal interaction molecule* (STIM) Proteine zu Oligomeren in der ER Membran zusammen und aktivieren die in der Plasmamembran befindlichen Orai Kanäle, die wiederum Calcium ins Zytosol befördern. Ein anderen Weg das ER zu entleeren, führt über spannungssensitive Calciumkanäle (Ca<sub>v</sub>) in der Plasmamembran. Ein geringer Einstrom durch die Ca<sub>v</sub> Kanäle kann zur Aktivierung von Ryanodin Rezeptoren (RyR) führen. In speziellen Zelltypen (Skelettmuskel) sind die Ca<sub>v</sub> Kanäle direkt an die RyR gekoppelt (entnommen aus Soboloff et al. 2012).

Eine Auswahl an Proteinen, die an der Generierung eines Calciumsignals und der Rückkehr zum basalen Calciumlevel beteiligt sind, ist in Abb.5 gezeigt. Als Stimulus startet das Binden eines Liganden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Calciumsignalkaskade. Dieser

---

aktiviert die Phospholipase C (PLC), die wiederum das in der Plasmamembran verankerte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in die *second messenger* Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. Während DAG in der Plasmamembran verweilt und dort Enzyme an die Zellmembran rekrutieren kann, diffundiert IP<sub>3</sub> zum ER und entleert durch das Binden an den in der ER Membran befindlichen IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R) das selbige (Berridge 2009). *Stromal interaction molecule* (STIM) Proteine sensieren einen Konzentrationsabfall an Calcium im ER und lagern sich zu Oligomeren zusammen, wodurch die SOAR/CAD Domäne (*STIM-Orai activating region/ CRAC-activating domain*) der STIM Moleküle mit den Orai Kanälen interagieren kann (Calloway et al. 2010; Kim and Muallem 2011). Die Orai Kanäle leiten durch eine Konformationsänderung Calcium aus dem extrazellulären Raum ins Zytosol (Muik et al. 2012). Dieser Prozess wird als *store operated calcium entry* (SOCE) bezeichnet (Hogan and Rao 2015). Aus dem Zytosol befördert die Sarko-/Endoplasmatische Calcium ATPase (SERCA) das Calcium unter Energieverbrauch wieder ins ER (Wuytack et al. 2002). Nachdem die Ausgangskonzentration an Calcium wieder eingestellt wurde, dissoziieren die STIM Oligomere. Aus dem Zytosol wird Calcium neben der SERCA durch den *mitochondrial calcium uniporter* (MCU) in die Mitochondrien und durch die *plasma membrane calcium ATPase* (PMCA) in den extrazellulären Raum transportiert (Pedersen and Carafoli 1987; Samanta et al. 2014; Lopreiato et al. 2014).

Neben diesem Beispiel für die Generierung eines Calciumsignals gibt es weitere Möglichkeiten die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zu verändern. Spannungssensitive Calciumkanäle (*voltage operated calcium channels* VOCC) reagieren auf eine Hyperpolarisation der Membran mit einem Calciumeinstrom (Felix 2005). Die vielen Unterfamilien von TRP (*transient receptor potential*) Kanälen sensieren unterschiedlichste Reize wie Temperaturveränderungen, mechanischen oder osmotischen Stress (Montell 2005; Clapham 2007).

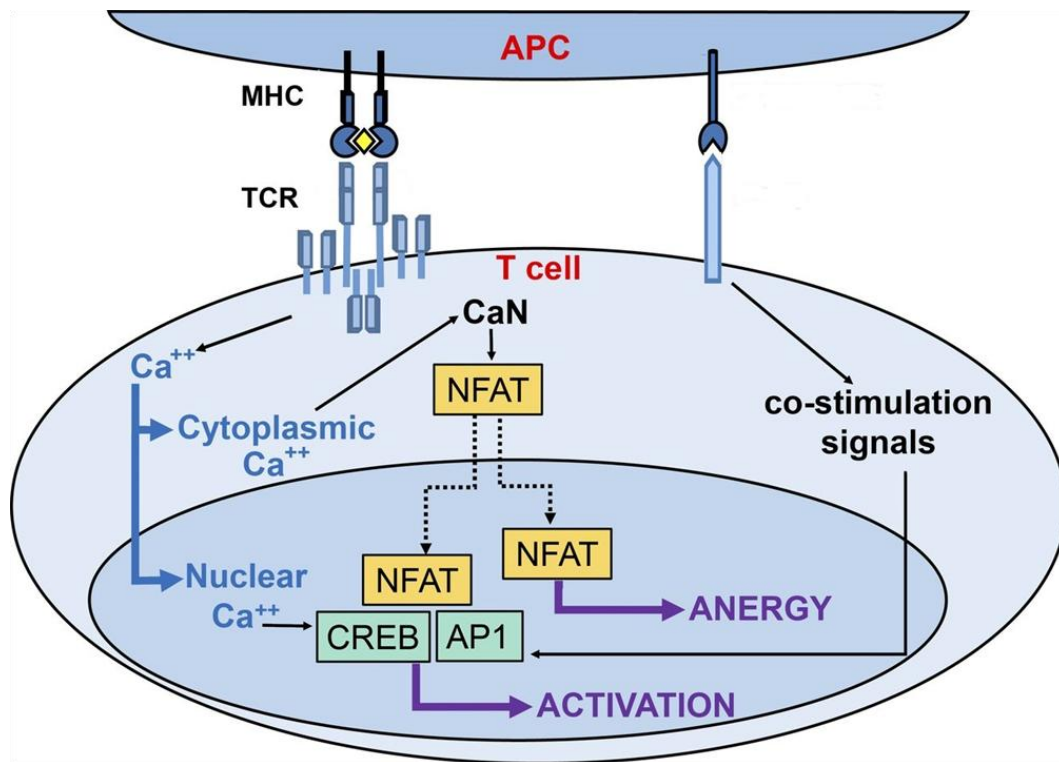


Abbildung 6: Calcium in der Immunantwort

Eine APC präsentiert an ihrer Oberfläche ein Antigen (gelb) mit ihrem MHC Komplex. Über den TCR Rezeptor wird eine zytosolische und eine nukleäre Calciumantwort in einer naiven T-Zelle generiert. Der Transkriptionsfaktor NFAT wird durch die Aktivität der calciumsensitiven Phosphatase Calcineurin im Zytosol dephosphoryliert. NFAT lokalisiert in den Kern. Dort initiiert es zusammen mit den Transkriptionsfaktoren *cAMP response element-binding protein* (CREB), das über nukleäres Calcium aktiviert wird, und *activator protein 1* (AP-1), das durch einen Costimulus aktiviert wird, eine volle Immunantwort. Bleibt die Costimulation aus oder wird das nukleäre Calciumsignal unterbunden, wird die Zelle nicht aktiviert, sondern anergisch (entnommen aus Monaco et al. 2016).

In dieser Arbeit ist die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  im Zusammenhang mit der Aktivierung von T-Zellen zu sehen. In Abb.6 sind die wichtigsten Faktoren für die calciumvermittelte Aktivierung von T-Zellen dargestellt. Im Aktivierungsprozess spielt Calcium eine zentrale Rolle (Lewis 2003). Das durch eine erhöhte  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  aktivierte Calmodulin bindet an die Phosphatase Calcineurin. *Nuclear factor of activated t-cells* (NFAT) wird durch Calcineurin dephosphoryliert. Eine Kernlokalisationssequenz wird offen gelegt und NFAT transloziert in den Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von verschiedenen Genen startet, die für eine Aktivierung wichtig sind (Macian 2005). Zu einer vollen Aktivierung müssen zusätzlich die Transkriptionsfaktoren *activator protein 1* (AP-1) und *cAMP response element-binding protein* (CREB) aktiviert werden. AP-1 wird durch nukleäres Calcium aktiviert. CREB benötigt die

---

durch einen Costimulus initiierte Signalkaskade zur Aktivierung (Monaco et al. 2016). Als Folge einer Aktivierung werden Zytokine wie IL-2 oder die  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) exprimiert. Diese werden oft als Marker einer Aktivierung genutzt (Malek 2008; Létourneau et al. 2009).

---

## 1.5 Zielsetzung

---

Humane Zellen sind in der Lage eine Vielzahl an Strahlenschäden, die durch ionisierende Strahlung erzeugt werden, zu reparieren. Viele Facetten der Reparaturmaschinerie wurden ebenso ausgiebig erforscht wie die Arretierung und Aufrechterhaltung eines Zellzyklusarrests. Dass auch Signalkaskaden außerhalb des Kerns auf das Zellschicksal Einfluss nehmen können, findet erst seit einigen Jahren mehr Beachtung.

Die Auswirkungen der Strahlung auf Zellen des humanen Immunsystems sind von besonderer Bedeutung. Immunzellen sind für die Abwehr von Pathogenen und eigenen entarteten Zellen verantwortlich. Fehlfunktionen im Immunsystem können gleicherweise schwerwiegende Konsequenzen haben wie   berfunktionen. Die vorliegende Arbeit wurde durch vorhergehende Befunden motiviert in denen beobachtet wurde, dass ionisierende Strahlung in Krebszellen Calcium mediierte Signalkaskaden auslöst. Wegen der zentralen Rolle von Calcium in Immunzellen bestand die Möglichkeit, dass ein ähnliches System auch eine Auswirkung auf das Immunsystem haben könnte. Daher wurde an dem Modellsystem der Jurkat Zellen untersucht, ob ionisierende Strahlung bei diesen Zellen Reaktionen hervorruft und ob diese in einem Zusammenhang mit der Immunreaktion stehen. Nach ersten Hinweisen darauf, dass Strahlung in Jurkat Zellen eine Vergrößerung des Zelldurchmessers induziert, wurde dieser mikroskopische Parameter als Maß einer Zellantwort auf Strahlungsstress untersucht. In diesem Zusammenhang wurde dann die Expression Proteinen charakterisiert, die typisch für spezielle T-Zell Signalwege sind. In den F  llen in denen eine zelluläre Antwort des Jurkat Zellen festgestellt werden konnte, soll genauer aufgeklärt werden, wie diese Reaktionen in bekannte Signalkaskaden einzuordnen sind. Dazu soll mit genetischen und chemischen Sensoren mit Hilfe von mikroskopischen Methoden überprüft werden, wie und in welcher kausalen Folge strahleninduzierte Signalkaskaden in Jurkat Zellen ablaufen. Der Einfluss von DNA Reparaturproteinen und Zellzykluscheckpoints soll genauer betrachtet werden, da diese zu Beginn einer Zellantwort auf ionisierende Bestrahlung stehen und alle weiteren Signalkaskaden, auch außerhalb des Kerns, anstoßen könnten.

---

Zusammen sollen die erhobenen Daten einen Aufschluss darüber geben, welche Prozesse nach Bestrahlung in Jurkat Zellen ablaufen, was die entscheidenden Proteine für eine Zellantwort sind und welche Konsequenzen sich daraus ergeben. Diese Thematik wurde in enger Zusammenarbeit mit Patrick Voos bearbeitet, wobei sich Herr Voos mehr mit den längerfristigen Effekten nach 48 h beschäftigte und diese Arbeit sich überwiegend auf die Initiierung der Signalkaskaden fokussiert. In dieser Arbeit werden ebenfalls Daten von Herrn Voos präsentiert, die für die Präsentation der komplexen Zusammenhänge wichtig sind; diese Beiträge sind auch deutlich gekennzeichnet.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Lösungen

---

Pufferlösung:	140 mM NaCl 4 mM KCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Mannitol 10 mM HEPES 2 mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,4
Immunopäzitations (IP) Puffer:	8,7 % Glycerin (v/v) 62,5 mM Tris (w/v) 2 % Bromphenolblau (w/v) vor Gebrauch: 2 % (v/v) β - Mercaptoethanol zugeben
NBT Lösung:	50 mg Nitroblautetrazolium (NBT) in 1 ml 70 % Dimethylformamid
BCIP Lösung:	50 mg BCIP ( <i>5-blue-4-chloro-3indolyl-phoshate-p-toluidine</i> ) in 1 ml 100 % Dimethylformamid
AP (Alkalische Phosphatase) Puffer	12,10 g Tris 5,81 g NaCl 1,02 g Magnesiumchlorid ad 1 l ddH <sub>2</sub> O (pH vorher mit HCl auf 9,5 einstellen)
Detektionsmix (Western Blot)	100 µl NBT-Lösung + 50 µl BCIP-Lösung + 15 ml AP Puffer
Propidiumiodid Lösung (FACS)	90 % PBS



	1 % FCS
	5% RNase A Stammlösung
	4 % Propidiumiodid (PI) Stammlösung
PI Stammlösung	0,5 mg/ ml
	38 mM Natriumzitat
	pH 7 einstellen und frisch ansetzen
RNase A Stammlösung	RNase A 5 mg/ ml
	10 mM TrisHCl
	15 mM NaCl
	pH 7 einstellen

---

## 2.2 Chemikalien

---

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, bei der Firma Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen) gekauft.

---

## 2.3 Zellen

---

Jurkat Zellen wurde von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 (Merck KGaA, Darmstadt) mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) inkubiert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Vor jedem Experiment wurden 4x10<sup>5</sup> Zellen pro ml ausgesät. Sollte der Tausch des Mediums erforderlich sein, erfolgte dieser durch Zentrifugation bei 800 g (Minifuge RF, Heraeus, Hanau). Das Zellepellet wurde dann in frischem Medium oder der jeweiligen Färbe- oder Pufferlösung gelöst. Die Zentrifugation zog keine Vergrößerung oder Auswirkung auf die Vergrößerung nach sich.

---

## 2.4 Bestrahlung der Zellen

---

Die Bestrahlung wurde, falls nicht anders angegeben, in einer Röntgenkammer durchgeführt. Die Röntgenbestrahlung (ISOVOLT Titan E 160, General Electric Sensing & Inspection Technologies, Ahrensburg) wurde mit einer Betriebsspannung von 90 kV und einer Stromstärke von 33,7 mA betrieben, wobei die Zellen in einem Abstand von 30 cm zur Quelle bestrahlt wurden.

---

## 2.5 Automatischer Mikroskopischer Zellzähler (EVE™)

---

Die Zellzählungen mit dem EVE Cell Counter (Nano EnTek Inc, Seoul, Korea) erfolgten laut Protokoll des Herstellers. Die Zellsuspension wurde mit einem äquivalenten Volumen Trypanblau (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) gefärbt. 10  $\mu$ l des Gemisches wurden in einen EVE Counting Slide pipettiert. Danach erfolgte die Zellzählung automatisiert. Jede Zählung wurde manuell mit der EVE PC Software (Version 1.0.3) überprüft, da sich der Auswertalgorithmus der EVE Software als ungenau erwies. Bei der unkuratierten automatischen Messung wurde die Zellgröße überschätzt, wodurch eine manuelle Auswertung und Korrektur des Zelldurchmessers von Nöten war. In Abb.7 ist dargestellt wie eine fehlerhafte Auswertung durch die EVE Software aussehen kann. Die Durchmesser der lebenden Zellen in blau ist größer als die eigentliche Zelle. Zudem werden Schmutzpartikel als Zellen gewertet. Die Zellzahl toter Zellen und die Viabilität können marginal von den reellen Werten abweichen. Die Durchmesser von zwei kleinen eng nebeneinander liegenden lebenden Zellen konnte teilweise nicht verändert werden. Daher wurden diese als "tot" markiert und fielen somit bei der Bestimmung des durchschnittlichen Durchmessers nicht ins Gewicht. Die Viabilität der Ansätze unterliegt einem geringen Fehler, da Zellen, die fälschlicherweise als tot gekennzeichnet werden mussten, die Viabilität leicht verringern. Dieser Fehler im Auswertalgorithmus tritt aber bei weniger als 2 % aller Zellen auf, wodurch dieser Effekt vernachlässigt werden kann.



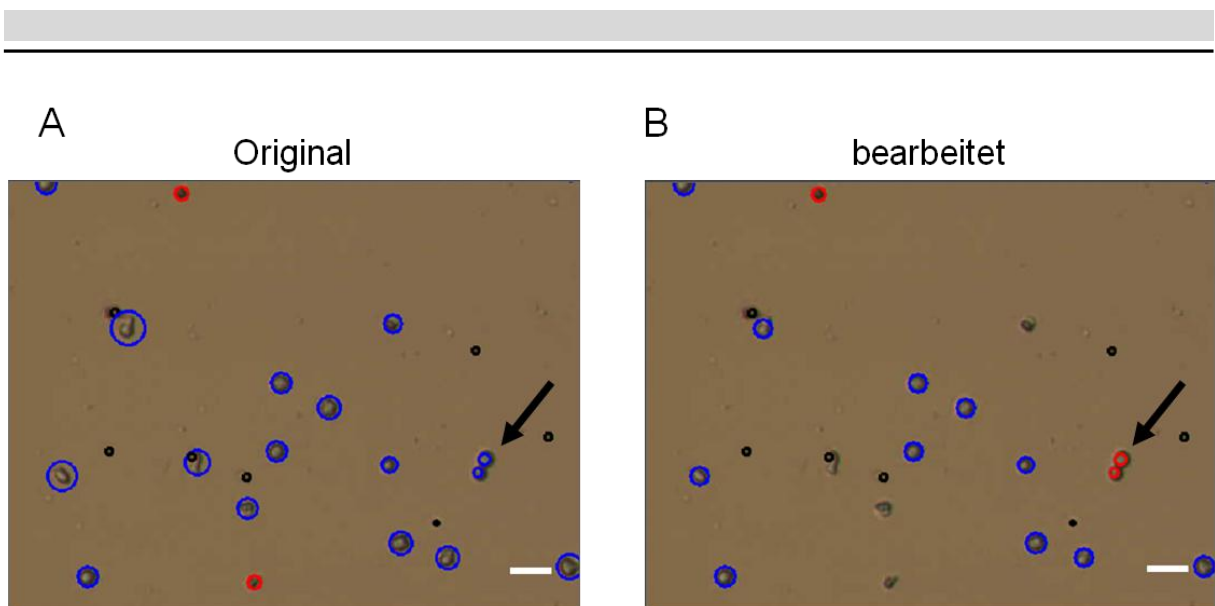


Abbildung 7: EVE Cell Counter Auswertsoftware

Beispielhafte Bilder der EVE Auswertsoftware. Lebende Zellen werden durch blaue Kreise repräsentiert, tote Zellen durch rote. Alles was außerhalb des Größenbereichs von 8-30  $\mu\text{m}$  liegt, wird mit einem schwarzen Kreis dargestellt. Mit einem schwarzen Pfeil sind Zellen gekennzeichnet, deren Größe aufgrund eines Fehlers im Auswertalgorithmus nicht verändert werden kann A) Unbearbeitete Originaldatei. Die Größe der Zellen wird überschätzt. Der schwarze Pfeil markiert zwei eng beieinander liegende lebende Zellen B) Die Durchmesser der Zellen wurden manuell angepasst. Mit dem Pfeil sind zwei tote Zellen markiert, da deren Größe nicht verändert werden kann.

## 2.6 Durchmesservergrößerung

Die strahlenbedingte Vergrößerung wurde durch verschiedene Strahlendosen induziert. Die Zellen wurden mit 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 7 und 10 Gy bestrahlt. Alle nicht strahleninduzierten Durchmesseränderungen wurden durch die Zugabe der jeweiligen Chemikalie zum Kultivierungsmedium erreicht.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde in den Konzentrationen 1, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{M}$  für 10 min zu den Zellen gegeben. Nach 10 min wurde das Medium durch frisches,  $\text{H}_2\text{O}_2$  freies Medium getauscht. Neocarcinostatin (NCS) wurde in den Konzentrationen 50, 100, 200 und 400 mg/ml zu den Zellen gegeben. Die Konzentrationen entsprechen in etwa einer Strahlendosis von 1, 2, 5 und 10 Gy (mündliche Kommunikation mit Alexander Löwer, TU Darmstadt). Die Zellen wurden 1 h mit 1, 10, 20 oder 50  $\mu\text{M}$  Etoposid (E1383) inkubiert, danach wurde das Medium durch Etoposid freies Medium getauscht. 20 ng/ml Demecolcin oder 3  $\mu\text{M}$  des CDK1 Inhibitors RO3306 (Axon Medchem, Groningen, Niederlande) sollten die Zellen im G2-Zyklus arretieren. Nach jeder Behandlung/Bestrahlung wurden die Jurkat Zellen über 48 h inkubiert und danach mit dem EVE Cell Counter automatisch gezählt wurden.

---

Die strahleninduzierte Vergrößerung sollte durch eine Behandlung vor Bestrahlung beeinflusst werden. Jurkat Zellen wurde mit 200  $\mu$ M Vitamin C und 20  $\mu$ M Trolox 18 h inkubiert. Die Vorbehandlung mit 10 mM NAC (N-Acetylcystein) erfolgte 1 h vor Bestrahlung. 50  $\mu$ M BAPTA-AM (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) wurden für 30 min zu den Zellen gegeben und durch frisches Medium getauscht. 100  $\mu$ M  $\text{LaCl}_3$  wurde 30 min vor Bestrahlung zu den Zellen gegeben. Der Phosphatase Inhibitor PP2 wurde für 1h in der Konzentration 500 nM und 50  $\mu$ M zum Medium gegeben. DSB Reparaturproteine wurden durch 5  $\mu$ M DNA-PK Inhibitor (Nu7441, Tocris Bioscience, Bristol, UK), 5  $\mu$ M ATM Inhibitor (Ku60019, Tocris Bioscience, Bristol, UK), 10  $\mu$ M ATR Inhibitor (S1060, Selleckchem, Houston, USA) oder 1  $\mu$ M PARP Inhibitor Olaparib (S1060, Selleckchem, Houston, USA) in ihrer Funktion beeinträchtigt. Jeweils 30 min vor Bestrahlung wurden die DSB Reparaturprotein Inhibitoren zu den Zellen gegeben. Die Bestrahlung nach den angegebenen Inkubationen erfolgte mit 2 Gy. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen im Inkubator über 48 h kultiviert bis sie mit dem EVE Cell Counter gezählt wurden.

---

## 2.7 Auftragen von Deckschichten auf Deckgläser

---

Für mikroskopische Untersuchungen wurde die Oberfläche von Deckgläsern ( $\varnothing$  25 mm) in einem Plasmaofen (Zepto-B, Diener electronic GmbH, Ebhausen) gereinigt und vorbereitet, bevor eine Deckschicht aufgebracht wurde. Mit Hilfe eines Spincoaters (PIN150, SPS Europe Spincoating, Putten Netherlands) wurden je nach Versuch verschiedene Deckschichten aufgebracht. 60  $\mu$ l des Coating Materials wurden auf der vorbereiteten Glasoberfläche durch den Spincoater über 30 s bei 500 rpm und anschließend über 30 s bei 3000 rpm verteilt. Für die Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Jurkat Zellen wurde erst eine Schicht PBS/ 5 % BSA aufgetragen. Nachdem diese Schicht getrocknet war, wurde sie mit einer zusätzlichen Schicht Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 75 kDa- 150 kDa) überschichtet. Die beschichteten Deckgläser konnten bei Raumtemperatur für 2 Tage oder bei 4 °C für 1 Woche aufbewahrt werden.

---

## 2.8 Bestimmung der 3D Zellform

---

Die Zellform lebender Jurkat Zellen wurde mit dem Plasmamembranfarbstoff CellMask™ Orange (Stock 1000x, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) bestimmt. CellMask™ Organe wurde in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Jurkat Zellen in Pufferlösung gegeben und für 5 min inkubiert. Danach wurden Aufnahmen in definierten Schritten aus verschiedenen Fokusebenen der Zellen mit dem Konfokalen Mikroskop Leica TCS SP (Leica, Heidelberg) angefertigt. Angeregt wurde mit dem 568 nm Argon Laser und detektiert zwischen einer Wellenlänge von 580 nm und 620 nm. Anschließend wurde mit dem Programm Fiji ein virtuelles drei dimensionalen Bild erzeugt indem die z-Stacks überlagert wurden. Die Ansicht der X-Z Ebene ließ Aussagen über die Zellform zu.

---

## 2.9 Lebendzellmikroskopie

---

---

### 2.9.1 Calcium Fluoreszenzmikroskopie

---

Die mikroskopische Untersuchung des Calciumlevels in lebenden Jurkat Zellen wurde an einem Konfokalen Leica SP5 II Mikroskop (Leica, Heidelberg) durchgeführt. Die Zellen wurden für 30 min in 2  $\mu$ M Fluo-4 AM (Life Technologies, Carlsbad, USA) in einer Pufferlösung (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 5 mM Mannitol, 10 mM HEPES, 2 mM  $CaCl_2$ , pH 7.4) auf beschichteten 25 mm Deckgläsern bei 37°C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Anschließend wurde der Calciumfarbstoff durch eine Fluo-4 freie Lösung ausgetauscht. Die Zellen wurden mit aufgedrehtem Pinhole in der äquatorialen Ebene und dem 63x Objektiv (HCX PL APO lambda blue 63.0x1.40 OIL UV) bei Raumtemperatur mikroskopiert. Fluo-4 wurde mit dem 488 nm Argon Laser angeregt; die Emission wurde bei 505 - 560 nm detektiert. Die Fluo-4 Emission zur Analyse der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in Jurkat Zellen wurde durch einen ROI um Einzelzellen bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde von der Fluoreszenzintensität der Zellen abgezogen. Eine Normierung der Minimalfluoreszenz auf 0 und der Maximalfluoreszenz auf 1 sollte verschiedene Experimente besser vergleichbar machen. Alle 3 s wurde eine Aufnahme gemacht. Die Grundfluoreszenz ohne Behandlung wurde für 5 min aufgenommen, danach wurde die Pufferlösung getauscht um eine Reaktion auf den Austausch des Mediums auszuschließen und für 5 min aufgenommen. Hiernach folgte der Tausch der Pufferlösung durch Pufferlösung mit 1, 10, 100  $\mu$ M  $H_2O_2$  oder dem Aktivator.

---

Die Fluo-4 Emission wurde für 15 min aufgenommen. Abschließend erzeugte die Zugabe von 5  $\mu$ M Ionomycin die für die Normierung verwendete Maximalfluoreszenz.

Die gleiche Durchführung erfolgte am modifizierten Mikroskop (GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung, Darmstadt) zur Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nach Bestrahlung mit einer 35 kV Röntgenröhre (80 mA, Dosisleistung 32 Gy/ min). Als Mikroskop diente ein Olympus IX71 (Olympus, Tokio, Japan) mit einem 60x (1,2 NA) Wasserimmersionsobjektiv. Die Pufferlösung wurde nicht getauscht und es wurde alle 5 s eine Aufnahme gemacht. Mikroskopiert wurde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

---

## **2.9.2 HyPer Fluoreszenzmikroskopie**

---

Die HyPer Plasmid DNA wurde mit Turbo Fect (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA), GeneJuice (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt) oder Lipofectamin (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in Jurkat Zellen laut den Herstellerangaben transfiziert. Zur Aufnahme wurden die Jurkat Zellen in Pufferlösung auf beschichtete Deckgläser pipettiert und innerhalb eines selbstgebauten Aluschälchens mikroskopiert. Angeregt wurde der HyPer Sensor mit 430 und 500 nm, die Emission wurde ab 505 nm detektiert. Die HyPer Fluoreszenzintensität wurde ebenfalls durch einen ROI für beide Anregungswellenlängen bestimmt. Der Quotient der Emission nach Anregung mit 500 nm durch die Emission nach Anregung mit 430 nm ergibt das HyPer Ratio. Nach der Aufnahme der unbehandelten Ausgangsfluoreszenz für 5 min wurden die Zellen mit 1 oder 10 Gy bestrahlt und für weitere 15 min detektiert bevor durch die Zugabe von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das maximale Ratio induziert wurde.

---

## **2.10 Immunfluoreszenzfärbung/ Foci Analyse**

---

Zur Untersuchung der Anzahl von DSBs wurden Zellen 20-30 min nach Bestrahlung mit 1 Gy, nach einer 10 minütigen Behandlung mit 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder nach einer 1 h Behandlung mit Etoposid mit 5 % Formaldehydlösung fixiert. Permeabilisiert wurde 5 min bei RT in einer 0,2 % igen Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt) Lösung in PBS. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde der 53BP1 (sc2760, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, USA) Primärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 in PBS eingesetzt und für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Einem weiteren Waschschrift mit PBS/0,5 % TWEEN folgte der

---

fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper Alexa488 (anti *rabbit* IgG, Life Technologies GmbH, Darmstadt), der für 1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert wurde. Abschließend wurden die Zellen in einer 2 µg/ ml Hoechst 33342 Lösung für 5 min inkubiert. Die Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham MA, USA) Lösung wurde durch PBS getauscht und die Zellen bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4 °C gelagert.

---

## 2.11 Datenverarbeitung

---

Als Bildanalyseprogramm wurde Fiji (ImageJ version 1.51k) eingesetzt. Das Verschieben des Deckglases in X-Y Richtung wurde mit dem Plug-in "*Template Matching*" korrigiert. Ratiometrische Bilder wurden mit dem Plug-in "*Ratio Plus*" erstellt. Die Korrektur eines Focusdrifts wurde manuell mit der Baselinekorrektur des Programms Clamp Fit (version 8.2.0.159) durchgeführt. Zur Erstellung der Abbildungen ebenso wie zum Fitten der Daten wurde das Programm OriginPro (version 9.0.0.87) verwendet.

---

## 2.12 Western Blot

---

Zur Untersuchung der Proteinkonzentration wurden  $1 \times 10^6$  Zellen 48 h nach Behandlung/ Bestrahlung bei 1600 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl IP (*immunoprecipitation*) Puffer gelöst. Der Zellaufschluss fand bei 99°C für 10 min und anschließender Inkubation im Ultraschallbad für 3 min statt. Auf einem 15 %igen SDS Gel wurden die Proteine für 40 min bei 230 V aufgetrennt. Als Größenmarker diente der *Color Protein Standard Broad Range* (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.). Nach dem Übertragen der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose oder PVDF Membran für 55 min bei 0,2 A, wurde die Membran in Magermilchpulver für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C geblockt. Nach drei Waschschritten mit TBS erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper GAPDH (#G8795 *mouse* monoclonal igM, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) als Ladekontrolle in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBS. Als weitere Primärantikörper wurden CD25 (#MA5-12680 *mouse* monoclonal IgG, Thermo, RNF-128 (#WA-Ai12260 *rabbit* polyclonal IgG, Biomol, Hamburg) und IL-2 (#92381 *rabbit* synth. monoclonal, Abcam, Camebridge, UK; #ABIN722511 *mouse* IgG monoclonal, Antikörper Online GmbH, Aachen) benutzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Fluoreszenzgekoppelter oder alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper verwendet. Nach

---

einem weiteren Waschschrift konnte der Fluoreszenzgekoppelte Antikörper mit Hilfe des Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) eingescannt werden oder die Membran wurde in 0,7 % NBT- 0,3 % BCIP-AP Detektionsmix inkubiert, wodurch nach 5 - 20 min Banden zu erkennen waren. Die Membran wurde anschließend eingescannt. Zusätzlich wurden mit dem automatisierten Western Blot System von Amersham (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) laut Herstellerprotokoll einige Western Blots testweise durchgeführt.

---

## **2.13 Zellzyklusanalyse durch Durchflusszytometrie (FACS)**

---

Zur Untersuchung des Zellzyklusverhalten von Jurkat Zellen wurden  $3 \times 10^6$  Zellen zentrifugiert und zweimal mit 5 ml PBS-EDTA (0,53 mM EDTA) gewaschen. Nach gründlichem resuspendieren der Zellen in 5 ml PBS-FCS (1 % Fetal Calf Serum) wurden die Zellen in 0,5 ml PBS gewaschen. Während die Zellsuspension gevortext wurde, wurde tropfenweise 10 ml eiskaltes Ethanol (100 %) zur Fixierung zugegeben und für mindestens 15 min bei 4°C inkubiert. Die Färbung des Zellkerns wurde über 30 min bei 37 °C mit einer Propidiumiodid Lösung lichtgeschützt durchgeführt. Hiernach konnte die Zellen mit dem BioRad S3 Cell Sorter (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA) und der FlowJo 10 Software (FlowJo LLC, Ashland, USA) analysiert werden.

---

## **2.14 Statistische Analyse**

---

Die Daten von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Sollten mehr oder weniger als drei unabhängige Experimente durchgeführt worden sein, ist dies in der jeweiligen Abbildungsunterschrift vermerkt. Als Signifikanztest diente der zweiseitige Student'sche T-test für zwei heteroskedastisch verteilte Stichproben. Das Signifikanzniveau wird durch Sterne (\*) dargestellt (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Falls sich die Werte um mindestens eine Größenordnung unterschieden, wurden das geometrische Mittel und der geometrische Fehler verwendet.

---

### 3 Ergebnisse

---

Ionisierende Strahlung (*ionizing radiation* (IR)) ist ein weitverbreitetes Werkzeug zur Behandlung in der Krebstherapie. Bei der Erforschung der Strahlenwirkung auf humane Zellen standen bisher die Schädigung der DNA und ihre Reparatur zum Erhalt der genomischen Integrität im Mittelpunkt des Interesses. Auf diesem Gebiet wurde durch jahrzehntelange Forschung schon fundiertes Wissen erlangt (Khanna and Jackson 2001; Jackson and Bartek 2009; Iyama and Wilson 2013; Santivasi and Xia 2014; Shibata and Jeggo 2014). In den vergangenen Jahren hat sich jedoch gezeigt, dass IR nicht nur im Zellkern eine Wirkung hat, sondern auch Prozesse außerhalb des Kerns beeinflusst. Details über die Auswirkungen der Strahlung auf zytoplasmatischer Ebene sind bisher weitestgehend unbekannt, aber nicht weniger von Bedeutung. In einer vorausgegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung über die Erhöhung von *reactive oxygen species* (ROS) die freie zytosolische Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) verändert und damit eine Signalkaskade stimuliert an deren Ende die Aktivierung eines calciumabhängigen Kaliumkanals in der Zellmembran steht. Anhand dieser Signalkaskade wird deutlich, wie weitreichend die Effekte ionisierender Strahlung auch außerhalb des Zellkerns sein können.

In dieser Arbeit soll die putative Auswirkung von Röntgenstrahlung auf die Immunzelllinie Jurkat untersucht werden. Für die Immunaktivierung von T-Zellen, zu deren Klasse Jurkat Zellen zählen, ist das *calcium signaling* nach dem Kontakt zu einem Antigen von zentraler Bedeutung (Feske et al. 2012; Fracchia et al. 2013). In der bereits angesprochenen vorhergehenden Arbeit konnte eine Signalkaskade charakterisiert werden, die über der Erhöhung des ROS Levels die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  verändert. Falls ionisierende Strahlung durch die beschriebene Signalkaskade ein ähnliches *calcium signaling* in Jurkat Zellen hervorruft wie es der Kontakt zu einem Antigen bewirkt, wäre es möglich, dass Strahlung Immunzellen unspezifisch, d.h. ohne Antigenkontakt aktivieren kann. Eine Aktivierung von naiven T-Zellen durch Antigene zeigt sich deutlich anhand der Vergrößerung der Zellen. Diese morphologische Änderung kann als erster Anhaltspunkt einer Aktivierung gedeutet werden (Gibson et al. 2016).

---

### 3.1 Einfluss ionisierender Strahlung auf die Morphologie von Jurkat Zellen

---

Eine Vergrößerung von eukaryotischen Zellen durch ionisierende Strahlung wurde bisher nicht in Zusammenhang mit einer stimulierenden Wirkung gesehen. Dass Strahlung eine Vergrößerung von Zellen bewirken kann, wurde meist im Falle der Hypertrophie von Geweben untersucht. Organe oder Gewebe vergrößern sich aufgrund der Verletzung durch die Bestrahlung (Coggle et al. 1986). Auch einzelne Zellen können als Reaktion auf eine Bestrahlung mit einem Anschwellen reagieren (Lee et al. 2004). Die Zellgröße als sehr auffällige und offensichtliche Veränderung wurde bisher nicht systematisch an Immunzellen nach Bestrahlung untersucht, obwohl die Zunahme des Zelldurchmessers in T-Zellen als Merkmal einer Aktivierung gilt (Gibson et al. 2016).

Der Zelldurchmesser von Jurkat Zellen wurde durch einen automatischen Zellzähler mikroskopisch bestimmt und für verschiedene Strahlendosen 24 h, 48 h und 72 h nach Bestrahlung ermittelt. 24 h nach Bestrahlung fand eine Vergrößerung in geringerem Maße als 48 h nach Bestrahlung statt. 72 h nach Bestrahlung sind vermehrt Zellen mit Durchmessern ähnlich der Kontrollzellen zu erkennen, wodurch die durchschnittliche Durchmessergrößerung ebenfalls wieder abnimmt. Da 48 h nach Bestrahlung die Vergrößerung am stärksten ausgeprägt war, wurde der Effekt der Vergrößerung zu diesem Zeitpunkt genauer untersucht (Abb.8 A).

Der Zelldurchmesser von unbestrahlten Jurkat Zellen beträgt im Mittel  $10,22 \mu\text{m} \pm 0,23 \mu\text{m}$ . Dieser Wert ist in Einklang mit Literaturwerten von  $11,5 \mu\text{m} \pm 1,5 \mu\text{m}$  (Rosenbluth et al. 2006). Nach Bestrahlung mit 2 Gy vergrößern Jurkat Zellen in den hier durchgeführten Experimenten ihren Durchmesser auf  $11,75 \mu\text{m} \pm 0,34 \mu\text{m}$ , nach 5 Gy sogar auf  $12,31 \mu\text{m} \pm 0,51 \mu\text{m}$ . Diese Vergrößerung ist gut erkennbar im Größenhistogramm, da eine Bestrahlung die Verschiebung der Größenklassen zu größeren Zelldurchmessern bewirkt (Abb. 8 B). Ein Fit der Daten mit der Gaußschen Normalverteilung (Gleichung 1) vereinfacht den Vergleich der Daten.

Gleichung (1) 
$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$



---

In Gleichung (1) ist  $x$  der Zelldurchmesser,  $\mu$  der Mittelwert des Zelldurchmessers und  $\sigma$  die dazugehörige Standardabweichung. Aus der Gleichung kann der prozentuale Anteil an Jurkat Zellen bestimmt werden, der in einem bestimmten Durchmesserbereich liegt.

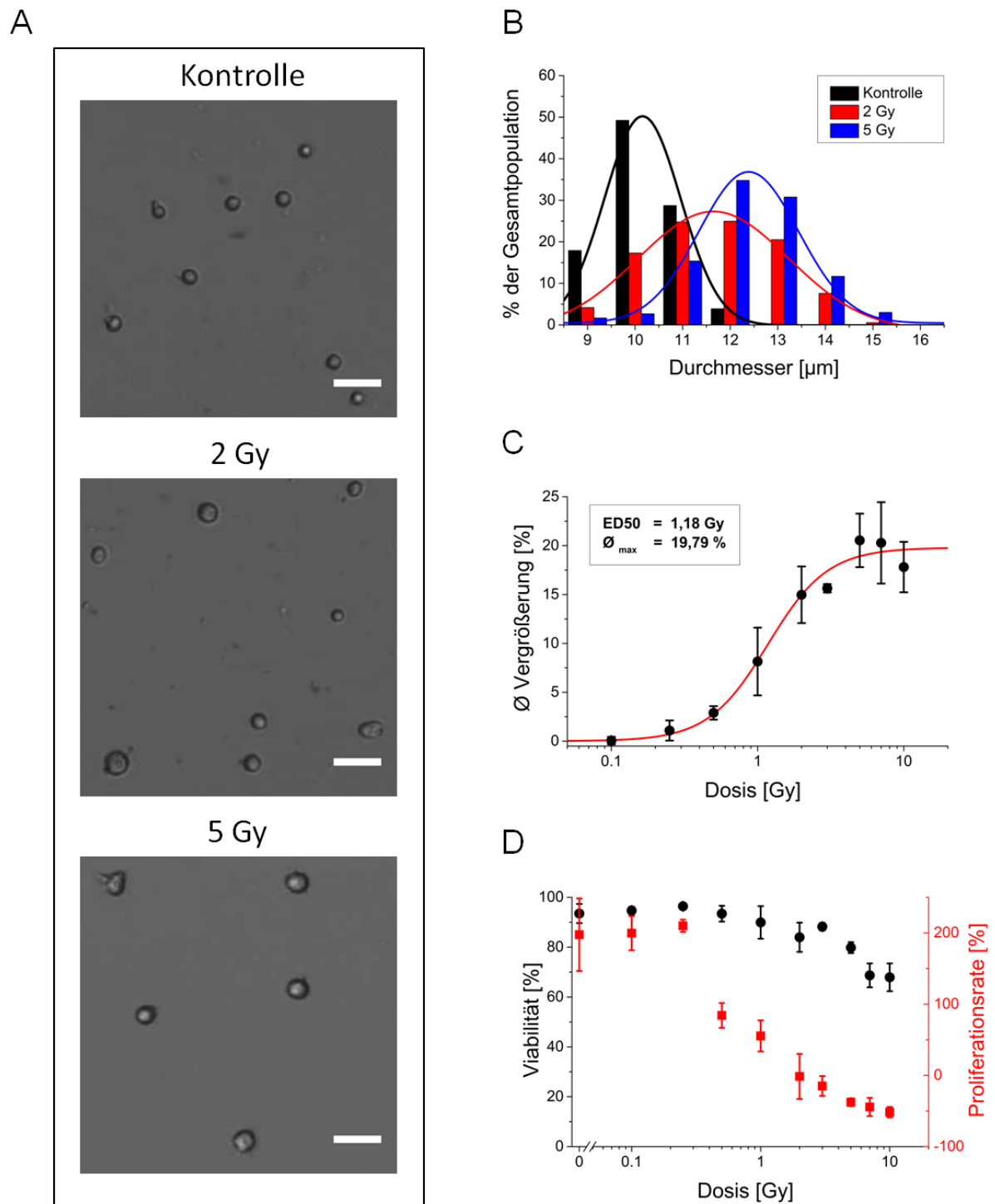


Abbildung 8: Vergrößerung des Zelldurchmessers von Jurkat Zellen 48 h nach Bestrahlung

A) Repräsentative Durchlichtaufnahmen von unbestrahlten, 2 Gy und 5 Gy bestrahlten Jurkat Zellen 48 h nach Röntgenbestrahlung (Größenstandard 35  $\mu\text{m}$ ). B) Durchmesserverteilungen von Zellpopulationen zu den in A) gezeigten Bestrahlungen (Kontrolle (unbestrahlt) n=111, 21108 Zellen; 2 Gy n=30, 2529 Zellen; 5 Gy n=6, 299 Zellen). Zum besseren Vergleich wurden die Daten jeweils mit der Gaußfunktion gefittet. C) Prozentuale Durchmesserergrößerung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle 48 h nach verschiedenen Strahlendosen. Ein logistischer Fit der Daten mit der Hill-Gleichung ergibt einen ED50 von 1,17 Gy und eine maximale Vergrößerung ( $\varnothing_{\text{max}}$ ) von 19,79 % (0,1 Gy, 0,25 Gy,

---

3 Gy n=3; 0,5 Gy, 1 Gy, 7 Gy, 10 Gy n=6). D) Proliferationsrate und Viabilität samt unbestrahlter Kontrolle zu den in C) gezeigten Daten

Die Untersuchung der Zellvergrößerung als Funktion eines großen Dosisbereiches von 0,1 bis 10 Gy zeigt einen sättigenden Verlauf bei einer logarithmischen Auftragung der Dosis. Ab einer Dosis von 5 Gy ist kein weiterer Größenzuwachs mehr zu erkennen. Der sättigende Verlauf wurde durch einen Fit mit der Hill-Gleichung (Gleichung 2) verdeutlicht. Der Hill-Fit dient nur zur besseren Veranschaulichung des Verlaufs der dosisabhängigen Durchmesserzunahme und zur Erhebung von Parametern, die für verschiedene Behandlungen vergleichbar sind. Es liegt kein spezielles Modell zugrunde, weshalb auf eine Interpretation des von 1 abweichenden Hill-Faktors verzichtet wird. Aus dem Fit ergeben sich eine halbmaximale Vergrößerung (ED50) bei einer Dosis von 1,17 Gy, eine maximale Durchmesserergrößerung ( $\emptyset_{\max}$ ) von 19,79 % und ein Hill-Faktor (k) von 2.12.

Gleichung (2)

$$f(x) = \frac{\emptyset_{\max}}{\left(\frac{ED50}{x}\right)^k + 1}$$

Gleichzeitig mit dem Zelldurchmesser wurden auch die Zellzahl und die Viabilität der Jurkat Zellen anhand einer Trypanblaufärbung automatisch bestimmt. Die Viabilität der Jurkat Zellen nimmt antiproportional zur Dosis ab. Je höher die Dosis desto geringer ist die Viabilität. Unbehandelte Kontrollzellen haben eine durchschnittliche Viabilität von 93,47 %  $\pm$  3,84%. Nach einer Bestrahlung mit 10 Gy sinkt die Viabilität 48 h nach Bestrahlung auf 67,91 %  $\pm$  5,57 %. Diese Werte geben lediglich eine Tendenz an, da die Werte für tote Zellen aufgrund eines Fehlers im Bestimmungsalgorithmus leicht von den reellen Werten abweichen können (siehe dazu 2.2.4). Zu Beginn jedes Experimentes wurden  $4 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Die Proliferationsrate beschreibt die Entwicklung der Lebendzellzahl 48 h nach Bestrahlung. Im Vergleich zu Kontrollzellen, die sich ohne Beeinflussung teilen können und eine Proliferationsrate von 197,53 %  $\pm$  50,93 % haben, teilen sich die Zellen nach einer Bestrahlung mit 2 Gy bereits nicht mehr (-1,58 %  $\pm$  31,67 %). Höhere Bestrahlungsdosen führen sogar zu einer Abnahme der vor Bestrahlung ausgesäten Zellzahl. Die Bestrahlung wirkt sich über 48 h stärker auf die Proliferationsrate als auf die Viabilität der Zellen aus, da durch die Schäden der DNA ein Zellzyklusarrest initiiert wird.

---

Eine nekrotische Vergrößerung der Zellen kann angesichts der hohen Viabilität 48 h nach Bestrahlung ausgeschlossen werden. Diese tritt auf, wenn Zellen irreparabel geschädigt werden (Majno and Joris 1995). Eine Erklärung der Vergrößerung nach Bestrahlung könnte eine Aktivierung der Jurkat Zellen sein. Falls die Zellen ohne Antigenkontakt durch die ionisierende Strahlung aktiviert werden sollten, müssten typische nach der Aktivierung exprimierte Proteine nachweisbar sein.

---

### **3.2 Nachweis von Schlüsselproteinen der Immunreaktion in Jurkat Zellen nach Bestrahlung**

---

Naive T-Lymphozyten liegen in einem inaktiven Ruhezustand vor. Sie befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase, progressieren dementsprechend nicht durch den Zellzyklus. Erst durch den Kontakt zu Antigenen an der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen werden sie in einen Zustand gebracht, indem sie eine spezifische Immunantwort ausführen können. Dieser Zustand wird im Rahmen der Immunantwort als aktiver Zustand bezeichnet.

Im inaktiven Zustand bestehen T-Lymphozyten zu einem großen Teil aus Zellkern (Rosenbluth et al. 2006). Nach einer Aktivierung fangen sie an zu proliferieren und vergrößern ihren Reaktionsraum, da sie sowohl für die Zellteilung an Masse und Volumen zunehmen müssen als auch für die Immunantwort verstärkt Proteine exprimieren müssen (Yusuf and Fruman 2003). Als quantifizierbare Größe für diesen Prozess kann der Zelldurchmesser genutzt werden (Gibson et al. 2016). In Abb.8 konnte bereits gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung eine dosisabhängige Vergrößerung des Zelldurchmessers in Jurkat Zellen bewirkt. In weiteren Versuchen sollte nun überprüft werden, ob Bestrahlung eine verstärkte Bildung des Zytokins Interleukin-2 (IL-2) und die Expression des Proteins CD25 bewirkt. Beide Proteine werden typischerweise bei der Aktivierung von T-Zellen hoch reguliert. IL-2 wird als Zytokin von aktivierten T-Zellen produziert und sezerniert um weitere T-Zellen zu stimulieren.

Die durch Aufschluss von  $1 \times 10^6$  Zellen erhaltene Proteinmenge wurde in einem Western Blot aufgetrennt. Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Hilfe spezifischer Primär- und Sekundärantikörper wurden die zu untersuchenden Proteine sichtbar gemacht. Der beispielhafte Western Blot in Abb. 9 zeigt, dass IL-2 in unbestrahlten Kontrollzellen nur in geringen Mengen gebildet wird. Eine Bestrahlung mit Röntgenbestrahlung führt nach 48 h zu

---

einer erhöhten Expression von IL-2 in Jurkat Zellen (N=2). Der strahleninduzierte Anstieg an IL-2 ist unabhängig von der Strahlendosis zwischen 2 Gy und 10 Gy, was darauf schließen lässt, dass diese Strahlendosen schon sättigend für den Prozess sind.

Als Positivkontrolle (+K) diente eine Antikörpermix (CD3/CD28/CD2), der nicht zu einer Vergrößerung führt, aber die Expression von aktivierungstypischen Proteinen steigern sollte. Die Normierung der IL-2 Proteinmenge auf die Gesamtproteinmenge ergab einen Faktor von mindestens 1,6 für die Erhöhung der IL-2 Proteinkonzentration nach Bestrahlung oder Behandlung mit dem Antikörpermix.

In Immunfluoreszenzfärbungen mit dem gleichen Primärantikörper gegen IL-2 wie in den Western Blot Versuchen aus Abb.9 A, konnte der Anstieg des IL-2 Levels 48 h nach Bestrahlung in fixierten und immunhistochemisch gefärbten Jurkat Zellen fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden (Abb.9 B unten). Es ist ebenfalls ein niedriges Level IL-2 Level in unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten, dieses Level steigt bei den gleichen Mikroskopieeinstellungen nach Bestrahlung deutlich an. Dieser Anstieg wurde quantifiziert indem zytosolische Bereiche durch ROIs (*region of interest*) in beispielhaften Zellen eingegrenzt wurden. Es wurden ausschließlich ROIs im Zytosol gesetzt, da IL-2 im Zytosol exprimiert wird und im Kern die Fluoreszenzintensität geringer als im Zytosol ist. Ein ROI um die komplette Zelle hätte somit die mittlere Pixelintensität in Abhängigkeit des Anteils des Nukleus in der Fokusebene negativ beeinflusst. Es wurde für die Kontrolle sowie 2 Gy und 5 Gy bestrahlte Zellen die mittleren Pixelintensitäten in ausgewählten Bereichen ermittelt und verglichen. Es konnte ein Anstieg der mittleren Pixelintensität von  $17,2 \pm 6,6$  (N=2; 29 Zellen) in Kontrollzellen zu  $53,8 \pm 19,95$  (N=2; 9 Zellen) in 2 Gy bestrahlten und  $40,7 \pm 17,3$  (N=2; 10 Zellen) in 5 Gy bestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Das Level an IL-2 Level erhöht sich nach Bestrahlung mit 2 Gy um einen Faktor von 3,12 und um einen Faktor von 2,4 Bestrahlung mit 5 Gy. Diese Steigerung ist sogar noch stärker als in den Western Blots gegen IL-2 nachgewiesen werden konnte.

Ein weiteres Protein, das typischerweise nach einer Aktivierung exprimiert wird, ist die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors (IL-2R $\alpha$ ; CD25). CD25 wird nur exprimiert, wenn eine volle Aktivierung der T-Zellen durch Antigen und Costimulus stattgefunden hat. Durch das Binden von CD25 an den IL-2 Rezeptor wird dieser hochsensitiv für IL-2. Western Blot Kontrollexperimente in Abb.9 zeigen, dass eine Stimulation der Jurkat Zellen mit dem

---

Antikörpermix zu einer deutlichen Erhöhung der CD25 Expression 48 h nach Behandlung führt. Eine Bestrahlung mit 2 Gy, 5 Gy oder 10 Gy hat hingegen keinen erkennbaren Effekt auf die CD25-Konzentration 48 h nach Bestrahlung.

Im Zustand der Anergie sind T-Zellen nicht in der Lage eine Immunantwort auszuführen. Zur vollen Immunaktivierung werden ein Antigenkontakt und ein Costimulus benötigt. Bleibt der Costimulus aus, begibt sich die Zelle in den anergischen Zustand. Es wurde bereits gezeigt, dass das Expressionslevel von IL-2 in Jurkat Zellen nach Bestrahlung ansteigt. Zur Überprüfung, ob die Zellen sich in einem nicht anergen Zustand befinden, wurde das Expressionslevel von RNF-128, einem Protein, das in anergischen T-Zellen hochreguliert wird (Anandasabapathy et al. 2003; Fathman and Lineberry 2007; Whiting et al. 2011), überprüft. RNF-128 verhindert die Expression von IL-2, wodurch eine Autoimmunreaktion verhindert wird. Die Daten in Abb.9 C zeigen, dass weder Bestrahlung noch die Behandlung mit dem Antikörpermix über 48 h zu einem veränderten Expressionslevel von RNF-128 nach Bestrahlung/ Behandlung in Jurkat Zellen führen. Daher ist auszuschließen, dass sich Jurkat Zellen nach Bestrahlung in einen anergischen Zustand begeben

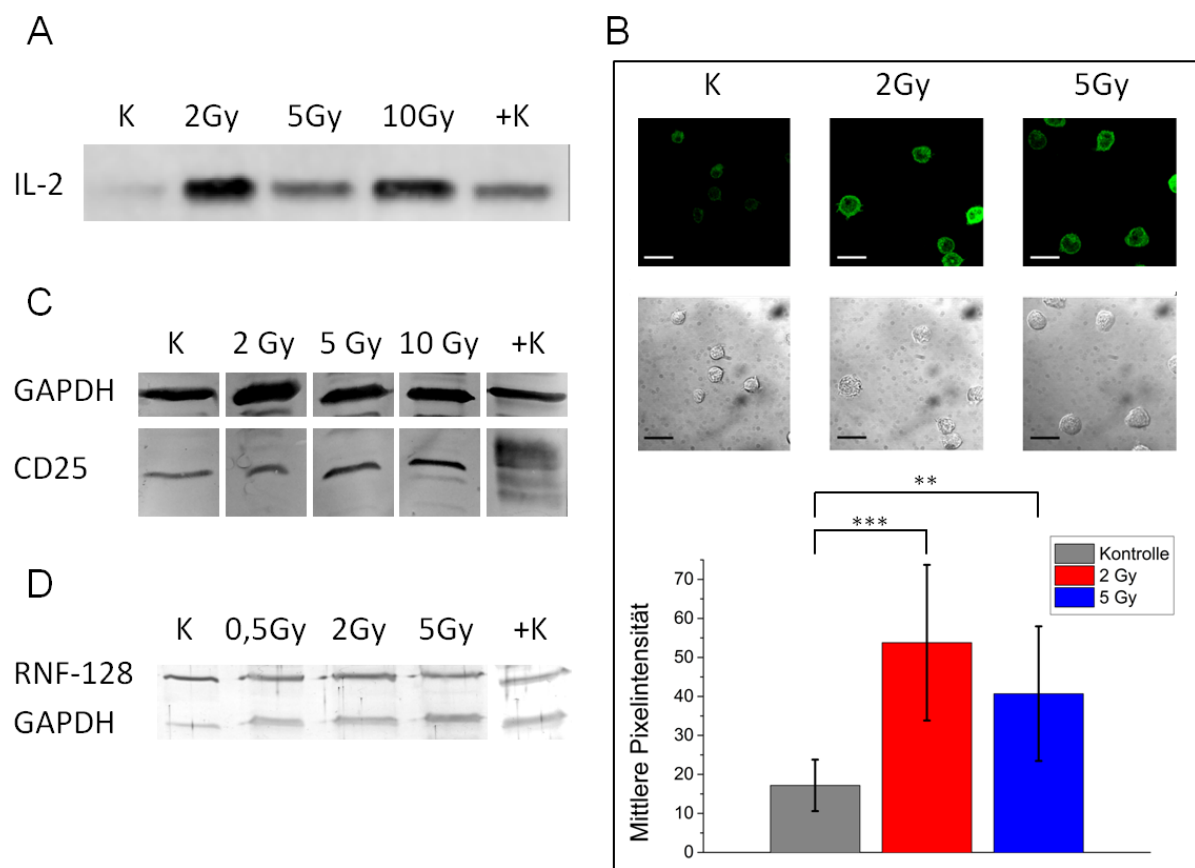


Abbildung 9: Expressionslevel typischer Proteine, die eine Aktivierung oder Anergie von T-Lymphozyten anzeigen

Die Proteinmenge von  $1 \times 10^6$  Jurkat Zellen wurde für Western Blot Analysen isoliert. A) Das IL-2 Proteinlevel wurde 48 h nach Bestrahlung/ Behandlung mit einem CD3/CD28/CD2 Antikörpermisch (+K) in einem Western Blot bestimmt. Eine Normierung auf die Gesamtproteinkonzentration (nicht gezeigt) ergab einen Anstieg der IL-2 Konzentration nach Bestrahlung/Behandlung um den Faktor 2. B) Eine Erhöhung der IL-2 Konzentration ergab sich auch in Immunfluoreszenzfärbungen gegen IL-2 (oben) 48 h nach Bestrahlung. In den Durchlichtaufnahmen (mitte) ist eine Vergrößerung der Zellen zu sehen. Mit Hilfe von ROIs wurden die mittleren Pixelintensitäten zytoplasmatischer Regionen um die bestimmt (unten), die einen quantitativen Vergleich zwischen den Bestrahlungen und der Kontrolle ermöglichten. (Kontrolle N=2, 29 Zellen; 2 Gy N=2, 9 Zellen; 5 Gy N=2, 10 Zellen) C) Das Expressionslevel von CD25 wurde 48 h nach Bestrahlung/ Behandlung in einem Western Blot bestimmt. Als Ladekontrolle ist GAPDH gezeigt. D) Das Expressionslevel von RNF-128 wurde 48 h nach Bestrahlung/ Behandlung in einem Western Blot gezeigt. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Die bisherigen Daten zeigen, dass die Bestrahlung von Jurkat Zellen mit ionisierender Strahlung zwar zur Expression von IL-2, aber nicht zu einer erhöhten Expression von CD25 führt. Die Expression von IL-2 verstärkt sich um einen Faktor von ungefähr 2. Da das IL-2 Level nur wenig ansteigt und das Zytokin ferner zur Stimulation weiterer T-Zellen sezerniert wird, ist es möglich, dass das Signalmolekül nicht über eine kritische intrazelluläre

---

Schwellenkonzentration, die für eine Reaktion notwendig ist, ansteigt. Der Nachweis von IL-2 im Medium brachte keine verwertbaren Ergebnisse. Obwohl die Jurkat Zellen weder in Kontakt zu einem Antigen noch zu einem Costimulus waren, spricht dies für eine Teilaktivierung der Jurkat Zellen durch Bestrahlung. Der Zustand der Anergie wird nach Bestrahlung nicht induziert, da die Proteinkonzentration für RNF-128 bei allen Bestrahlungen unverändert zur Kontrolle bleibt.

Die Ursachen für diese strahleninduzierte Teilaktivierung sollen im Folgenden geklärt werden. Es gibt drei potentielle Signalwege, die für die Vergrößerung und Teilaktivierung der Jurkat Zellen verantwortlich sein können.



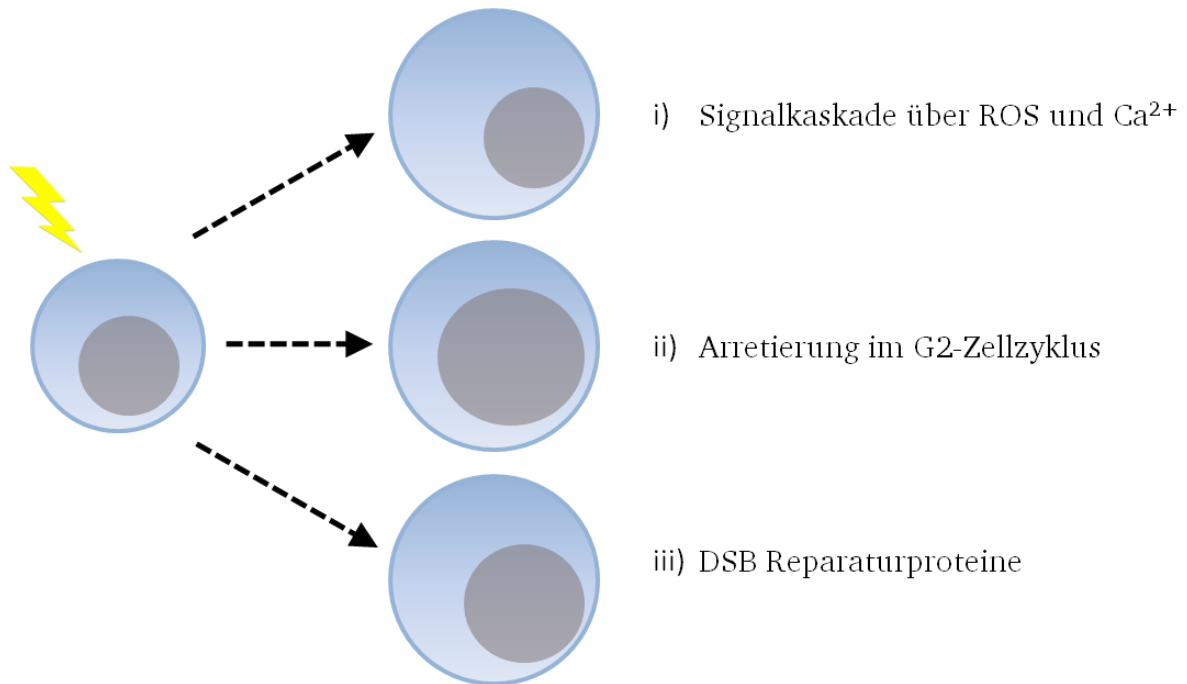


Abbildung 10: Potentielle Signalwege für eine strahleninduzierte Vergrößerung

- i) Eine Signalkaskade aktiviert die Jurkat Zellen über einen ROS und Calcium vermittelten Signalweg.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Calcium sind als *second messenger* beide in der Lage viele Zellprozesse zu beeinflussen
- ii) Die Arretierung im G2-Zellzyklus bewirkt die Vergrößerung, da Jurkat Zellen zu mehr als 50 % aus Nukleus bestehen und dieser in der G2-Phase deutlich größer als in der G1-Phase ist
- iii) Proteine, die an der DSB Reparatur beteiligt sind, bewirken ein Anschwellen der Zelle um mehr Platz für Proteine der Reparatur zu schaffen. Um die DNA zugänglich für Reparaturproteine zu machen, wird diese lokal entwunden

Eine Kombination aus zwei oder allen drei möglichen Hypothesen ist durchaus denkbar. Die DSB Reparatur ist eng an einen G2-Arrest gekoppelt. Einige Proteine, die an der DSB Reparatur beteiligt sind, können einen Zellzyklusarrest bewirken, damit die Zelle nicht mit DNA Schäden durch die Mitose läuft und es zu einer fehlerhaften Zellteilung kommt (Dasika et al. 1999; Brnzei and Foiani 2008). Welche Hypothese(n) im Speziellen in Frage kommen und wie sie zusammenspielen, wird im Folgenden systematisch untersucht.

---

### 3.3 Beeinflussung der strahleninduzierten Vergrößerung

---

Eine Vorbehandlung der Jurkat Zellen vor Bestrahlung sollte eine potentielle Vergrößerung beeinflussen und die beteiligten Signalkaskaden eingrenzen. Des Weiteren wurden Agenzien eingesetzt, die ohne Bestrahlung eine Vergrößerung hervorrufen sollten, da sie eine der drei potentiellen Signalkaskaden stimulieren. Der Durchmesser wurde mit dem automatischen Zellzähler EVE 48 h nach der Bestrahlung/ Behandlung bestimmt.

Um die Beteiligung einer ROS-vermittelten Signalkaskade in der Strahlenantwort von Jurkat Zellen zu testen, wurden mögliche ROS, die in Folge von Röntgenbestrahlung entstehen, durch ROS *scavenger* (Radikalfänger) abgefangen. Diese Maßnahme sollte zu einer Unterbindung der Signalkaskade führen, sofern ROS als second messenger für die Signalweiterleitung essentiell sind. Darüber hinaus sollte sich in Anwesenheit der ROS *scavenger* auch die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nicht mehr verändern.

In Abb. 11 ist zu erkennen, dass die Inkubation von Zellen in Medium mit den ROS *scavenger* N-Acetylcystein (NAC) oder Vitamin C in Kombination mit Trolox nicht in der Lage sind die Vergrößerung durch die Bestrahlung mit 2 Gy Röntgenstrahlung zu beeinflussen. Die Unempfindlichkeit der zellulären Reaktion gegenüber ROS *scavengern* deutet darauf hin, dass ein Anstieg an ROS keine zentrale Rolle bei der Vergrößerung der Jurkat Zellen spielt. Zur weiteren Überprüfung des Befunds wurden Jurkat Zellen für 10 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $H_2O_2$  im extrazellulären Medium behandelt und anschließend in frischem Medium für 48 h kultiviert. Nach 48 h wurde der Durchmesser der Jurkat Zellen mit dem automatischen Zellzähler bestimmt. Erstaunlicherweise zeigte sich eine konzentrationsabhängige Vergrößerung der Jurkat Zellen, die einen sättigenden Verlauf ab einer Konzentration von ca. 200  $\mu M$   $H_2O_2$  zeigt (Abb.11 B). Ein Fit der Daten mit der Gleichung (2) ergibt die  $H_2O_2$ -Konzentration bei einer halbmaximalen Vergrößerung (ED50) einen Wert von 49  $\mu M$ . Die maximale Durchmessergrößerung liegt bei  $\sim 10 \%$  und der Hill-Faktor ist 1.

Diese Daten implizieren einen Zusammenhang zwischen ROS und der Durchmessergrößerung. Dabei kann aber nur ein Teil der Vergrößerung auf die ROS zurückgeführt werden. Die maximale strahleninduzierte Durchmessergrößerung ist mit  $\sim 20 \%$  doppelt so stark wie die allein durch ROS vermittelte Vergrößerung. Der ROS

induzierte Anteil liegt hiermit bei  $\sim 50\%$  der Vergrößerung. Folglich muss es eine weitere Ursache für die übrigen  $50\%$  der strahleninduzierten Vergrößerung geben.

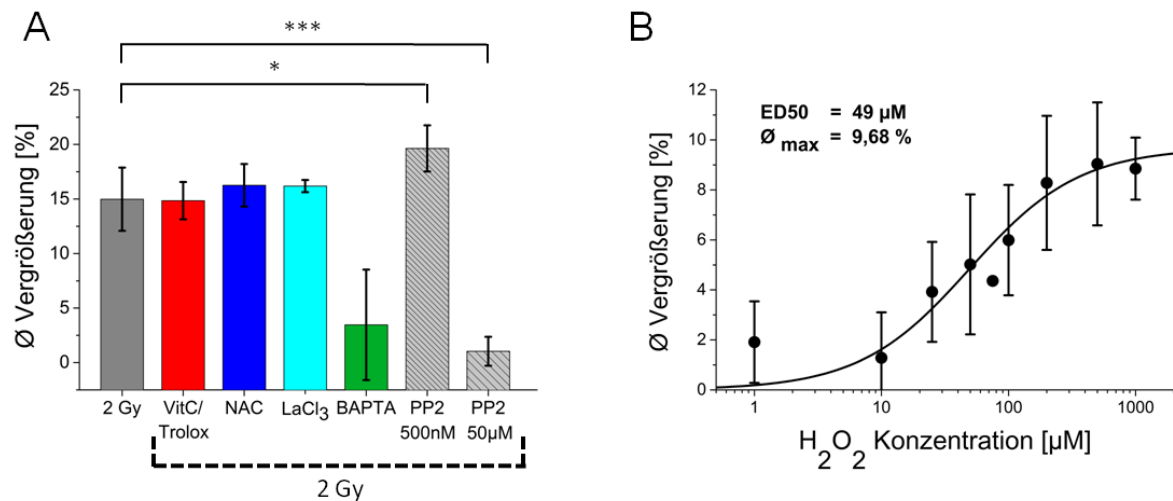


Abbildung 11: Mögliche *second messenger* einer IR induzierten Zellvergrößerung

A) Die Vorbehandlung von Jurkat Zellen mit unterschiedlichen Agenzien sollte die strahleninduzierte Vergrößerung 48 h nach Bestrahlung beeinflussen. Alle Proben wurden mit 2 Gy bestrahlt; als Referenz dient eine unbehandelte mit 2 Gy bestrahlte Probe (grau). Die Inkubation der Jurkat Zellen 18 h vor Bestrahlung mit den Antioxidantien Vitamin C und Trolox (rot) führte ebenso zu keiner Veränderung der Vergrößerung wie der ROS scavenger NAC (blau) oder der Block des Calciumeinstroms aus dem extrazellulären Raum mit LaCl<sub>3</sub>. Eine Inkubation in Medium mit 50 µM BAPTA-AM verringerte hingegen die strahleninduzierte Vergrößerung (grün). PP2, ein Inhibitor für die SRC Kinase Familie, verhindert in einer Konzentration von 500 nM die strahleninduzierte Vergrößerung nicht. In einer Konzentration von 50 µM wird die Vergrößerung verhindert. B) Jurkat Zellen wurden 10 min in unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen inkubiert, gewaschen und für 48 h weiter kultiviert. Diese Behandlung führt über 48 h zu einer konzentrationsabhängigen Vergrößerung des Zelldurchmessers. Die Zunahme zeigt einen sättigenden Verlauf wie in Abb.8, der mit der Hill-Funktion (Gleichung 2; ED50 = 49 µM; Ø<sub>max</sub> = 9,68 %; k = 1) gefittet werden kann (Mw. ± Stabw. von  $\geq 3$  unabhängigen Experimenten; Signifikanztest durch Student'schen t-test \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001).

Im weiteren Verlauf der ROS-vermittelten Signalkaskade sollte die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  eine wichtige Rolle spielen. Eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  kann zwei Quellen haben. Zum einen kann Calcium aus dem extrazellulären Raum ins Zellinnere strömen, zum anderen kann Calcium aus den internen Speichern wie dem Endoplasmatischen Reticulum oder den Mitochondrien ins Zytosol entlassen werden. Der Einstrom von Calcium aus dem zellumgebenden Medium sollte durch die Zugabe von Lanthanchlorid (LaCl<sub>3</sub>) zum Medium verhindert werden. La<sup>3+</sup> ist ein etablierter Blocker der *calcium release activated channels* (CRAC) (Hoth and Penner 1993). Dieser Kanaltyp ist für einen Calciumeinstrom aus dem

---

extrazellulären in den intrazellulären Raum verantwortlich. Der Einsatz von 100  $\mu\text{M}$   $\text{LaCl}_3$  hatte keinen Effekt auf die strahleninduzierte Vergrößerung (Abb.11), obwohl diese Konzentration ausreichend sein sollte, um einen CRAC-vermittelten Calciumeinstrom völlig zu verhindern (Aussel et al. 1996). Neben dem CRAC gibt es weitere Kanäle, die für einen Calciumeinstrom verantwortlich sein können. Ein Beispiel ist der TRPM2 Kanal, der sogar durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  aktivierbar ist (Grupe et al. 2010). Allerdings sollten mikromolare Konzentrationen von  $\text{La}^{3+}$  den TRPM2 Kanal blocken. Ein Einstrom von Calcium aus dem extrazellulären Raum scheint daher nicht der limitierende Schritt bei der Vergrößerung zu sein.

Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch Entleeren der internen Speicher sollte durch den zellpermeablen Calciumchelator BAPTA-AM (*1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)*) effizient gepuffert werden. BAPTA puffert neben dem Calciumeinstrom aus dem intrazellulären Speicher aber auch den Calciumeinstrom aus dem extrazellulären Raum. Die Daten in Abb.11 zeigen, dass der Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  BAPTA-AM eine strahleninduzierte Vergrößerung der Jurkat Zellen unterdrückt. Der durchschnittliche Zelldurchmesser nach Vorbehandlung mit BAPTA-AM und anschließender Bestrahlung liegt nur leicht über dem Niveau der unbestrahlten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  eine wichtige Rolle im Prozess der Vergrößerung spielt. Nachdem BAPTA-AM von zelleigenen Esterasen in seine aktive Form überführt wurde, kann es nicht mehr aus der Zelle diffundieren und verbleibt somit über einen längeren Zeitraum in der Zelle. Daher ist der Zeitpunkt, an dem Calcium als Signalmolekül dient, unbekannt. Neben den ROS muss ein weiterer Signalweg die Vergrößerung bzw. die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  beeinflussen.

Kinasen der SRC Familie spielen bei der Initiierung der Immunantwort eine wichtige Rolle und stehen eng in Verbindung mit einer TCR (*T-cell receptor* (T-Zellrezeptor)) vermittelten Immunantwort (Salmond et al. 2009). Eine Inhibition dieser Kinasefamilie könnte eine strahleninduzierte Vergrößerung beeinflussen, da durch ionisierende Strahlung ähnliche Signalwege stimuliert werden könnten wie nach der Aktivierung des TCR. Der Kinaseinhibitor PP2 gilt in geringen Konzentrationen (nanomolarer Bereich) als spezifischer Inhibitor der SRC-Kinasefamilie. In höheren Konzentrationen (mikromolarer Bereich) werden allerdings unselektiv viele weitere Kinasen inhibiert (Brandvold et al. 2012). Der Kinaseinhibitor PP2 wurde 1 h vor der Bestrahlung mit 2 Gy in den Konzentrationen 500 nM und 50  $\mu\text{M}$  zu Jurkat

---

Zellen gegeben. Nach Bestrahlung wurden die Zellen über 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zelldurchmesser mit dem EVE Cell Counter automatisch bestimmt. Die Daten in Abb.11 zeigen, dass eine Konzentration von 500 nM die strahleninduzierte Vergrößerung nicht beeinflusst. In einer Konzentration von 50  $\mu$ M wird eine Vergrößerung gänzlich verhindert. Die SRC Kinasefamilie scheint keine entscheidende Rolle bei einer strahleninduzierten Vergrößerung von Jurkat Zellen zu spielen, da 500 nM keinen Effekt auf die Vergrößerung haben. Allerdings scheint ein Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Vergrößerung und Kinasen im Allgemeinen zu bestehen. Zu diesem Zeitpunkt kann noch nicht genau gesagt werden, welche Kinase im speziellen die Vergrößerung bedingt, da PP2 in der eingesetzten Konzentration von 50  $\mu$ M unselektiv die Funktion von vielen Kinasen beeinträchtigt.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass ROS scavenger und  $\text{LaCl}_3$  die strahleninduzierte Vergrößerung nicht beeinflussen. Eine Beteiligung von ROS an der Vergrößerung scheint trotzdem zu bestehen, da eine 10 minütige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung konzentrationsabhängig über 48 h eine Vergrößerung induziert. Eine maximale Vergrößerung nach  $\text{H}_2\text{O}_2$  Behandlung liegt bei  $\sim 10\%$ . Neben ROS spielen auch Calcium und die Aktivität von Kinasen eine wichtige Rolle bei der strahleninduzierten Vergrößerung, denn das Abpuffern der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  mit dem Calciumchelator BAPTA verringert die Zellvergrößerung nahezu auf das Niveau unbehandelter Kontrollen. Die gleiche Verringerung wird durch mikromolare Konzentrationen des Kinaseinhibitors PP2 erreicht. Eine Vergrößerung nach Bestrahlung scheint durch mehrere Faktoren beeinflussbar zu sein, was einen komplexen Signalweg andeutet. Zur genaueren Aufklärung dieser Signalkaskade werden verschiedene Signalkaskaden nach Bestrahlung im Folgenden näher charakterisiert.

---

### 3.4 Auswirkung ionisierender Strahlung auf zytosolische Signalkaskaden

---

In einer vorausgegangenen Arbeit wurde eine durch ionisierende Strahlung induzierte Signalkaskade charakterisiert, in der primär ROS gebildet wird, was wiederum zu einem Anstieg an  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  führt. In Folge dessen werden Calcium-empfindliche Prozesse gestartet; dazu gehört die Aktivierung eines Calcium-abhängigen Kaliumkanals und die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zellen (Roth et al. 2015; Gibhardt et al. 2015). Die langfristigen Auswirkungen auf das Zellschicksal wurden bisher nicht untersucht. Ob und wie

---

diese Signalkaskade genau in Jurkat Zellen stattfindet, soll durch Lebendzellmikroskopie untersucht werden.

Sowohl ROS als auch Calcium sind als *second messenger* in der Lage eine Vielzahl zellulärer Prozessoren zu initiieren oder weiterzuleiten. Besonders interessant ist eine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  im Hinblick auf die Immunaktivierung, da Calcium hier eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten spielt. Eine potenzielle Beeinflussung der Immunaktivierung durch Ingangsetzen einer strahleninduzierten Signalkaskade und einer mit dieser einhergehenden Änderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wäre daher naheliegend. Weitreichende Folgen könnten die Effektivität von naiven Immunzellen im Allgemeinen, aber auch Auswirkungen auf das metastasierende Wesen von Leukämiezellen sein.

---

### 3.4.1 Oberflächenbeschichtung von Deckgläsern

---

Ein zentraler Punkt in dieser Arbeit ist die mikroskopische Untersuchung der Krebszelllinie Jurkat. Jurkat Zellen gehören zur Gruppe der Immunzellen und im Speziellen zu den T-Lymphozyten. Jurkat Zellen stellen als Suspensionszellen im Vergleich zu adhärennten Zelllinien einige experimentelle Anforderungen an eine mikroskopische Lebenduntersuchung. Der Tausch bzw. Austausch des zellumgebenden Mediums ist unabdingbar, um definierte Stimuli zu setzen. Ein Anhaften der Jurkat Zellen an der Deckglasoberfläche ermöglicht es, die gleiche Zelle vor und nach einem Tausch des Mediums mikroskopieren zu können. Die Intensität der Anhaftung ist von entscheidender Bedeutung. Die Zellen lösen sich bei zu schwachem Anhaften ab, zu starkes Anhaften verformt die Zellen, wodurch sie ihren sonst sphärischen Korpus verlieren. Jurkat Zellen interagieren so stark mit Glasoberflächen, dass sie nach mehreren Minuten auf Glas ihre Form verändern und abflachen, wodurch die Beobachtung des kugelförmigen Ruhezustands nicht möglich ist. Eine zweckmäßige Interaktion zwischen Zelle und Untergrund wird durch das Aufbringen von Materialien als dünne Deckschicht auf die Glasoberfläche erzielt. Die Materialeigenschaften sind entscheidend für die Interaktion Glas/ Material, aber auch für die Interaktion Material/ Zelle. Die Deckschicht bestimmt den Anhaftungsgrad und dadurch die Zellform (Abb. 12 A-C). Der angestrebte Anhaftungsgrad, der den Austausch des umgebenen Mediums ohne eine Zellverformung gewährleistet, ist in Abb.12 B) dargestellt.

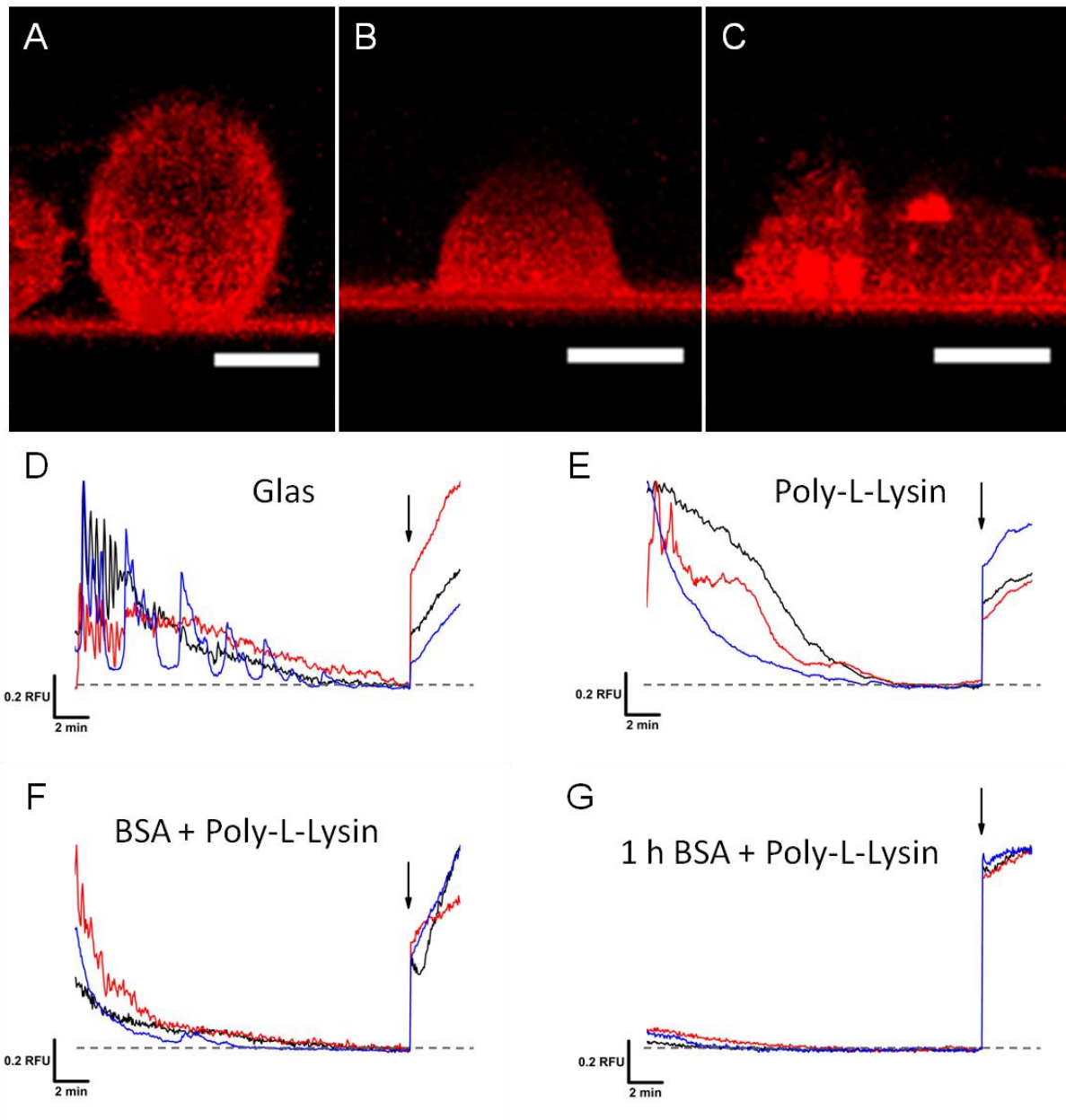


Abbildung 12: Exemplarische Anhaftungsmöglichkeiten von Jurkat Zellen

Die Plasmamembran von vitalen Jurkat Zellen wurden mit CellMask<sup>TM</sup> Orange gefärbt. Anschließend wurden mit einem konfokalen Mikroskop z-stacks erstellt. Gezeigt ist die y-z-Achse. Je nach Anhaftungsgrad können unterschiedliche Zellformen auftreten A) Die Zelle liegt ohne Anhaften mit einem kleinen Fuß auf dem Deckglas auf. B) Die Zelle haftet an und verändert ihre sphärische Form dabei nicht oder C) flacht ab und verändert ihre Form. D - G) Jurkat Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Gezeigt ist die Calcium Antwort in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) auf verschiedenen Glasdeckschichten. Mit einem Pfeil ist die Zugabe von 5 µM Ionomycin angedeutet, die eine maximale Fluoreszenzintensität erzeugte. Das basale Calciumniveau, das dem homöostatischen Ruhezustand entspricht, ist als gestrichelte graue Linie angedeutet D) Zellen unmittelbar nach dem Aufbringen auf unbeschichtete Deckgläser. E) Auf Poly-L-Lysin beschichtetem Deckglas unmittelbar nach Aufbringen auf das Deckglas. F) Auf BSA und einer zusätzlich Poly-L-Lysin Deckschicht direkt nach Zugabe. F) wie in E) nur mit einer Wartezeit von 1 h bevor mikroskopiert wurde.

---

In der Literatur gibt es bereits die unterschiedlichsten Variationen und Kombinationen für das Beschichten von Glasoberflächen zur Mikroskopie von lebenden Zellen. Da im Folgenden auch die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  untersucht werden sollte, war diese neben der Zellform ein zusätzliches Maß für einen unveränderten Ausgangszustand. Schon allein das Auftreffen der Jurkat Zellen auf die Deckglasoberfläche verursacht einen starken Anstieg des Calciumlevels (Abb.12 D-F), der sogar teilweise das maximale durch Ionomycin erzeugte Fluoreszenzniveau erreicht. Erst mehrere Minuten nach Auftreffen auf die Deckglasoberfläche erreicht das Calciumlevel wieder den Ausgangszustand. Dies verdeutlicht, wie sensibel Jurkat Zellen auf mechanischen Stress reagieren und wie wichtig ein geeignetes Deckschichtmaterial ist. Die meisten Deckschichten verursachen ein zu starkes Anhaften und ein Oszillieren der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  bereits ohne Stimulus. Die besten Ergebnisse für eine Anhaftung und ein schnelleres Erreichen des basalen Calciumlevels wurde mit einer Kombination aus einer Schicht *bovine serum albumin* (BSA) (5 % in PBS) und 0,01 % Poly-L-Lysin (PLL) erzielt (abgewandelt von Wolf et al. 2015, Abb.12.E). Auf diesem Deckschichtmix hafteten die Zellen ohne Veränderung ihrer Form so stark an wie in Abb.12 B dargestellt, sodass der Tausch des umgebenden Mediums möglich war. Die Zellen wurden mindestens 30 min vor der mikroskopischen Untersuchung auf das Deckglas gegeben. Das Calciumlevel erreichte nach einem kurzen Anstieg durch das Auftreffen auf das Deckglas innerhalb dieser Zeitspanne wieder sein basales Niveau. Diese Kombination aus der Zusammensetzung des Beschichtungsmaterials mit der Wartezeit nach Zugabe der Zellen auf das Deckglas ermöglichte es, geringe Änderungen der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zu beobachten. Diese Methode wurde für alle weiteren mikroskopischen Untersuchungen genutzt, da es für andere Signalmoleküle neben Calcium ebenfalls essentiell ist, dass sich Jurkat Zellen in ihrem Ruhezustand befinden.

---

### 3.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies nach Röntgenstrahlung

---

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) können auf eukaryotische Zellen konzentrationsabhängig entweder eine schädliche zytotoxische oder auch eine stimulierende Wirkung haben. Die meisten ROS ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $^1O_2$ ) sind sehr kurzlebig, sodass ihre Lebensdauer im Nano- bzw. Mikrosekunden Bereich liegt. In höheren Konzentrationen können sich ROS daher nur in ihrer langlebigsten Form, dem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), anreichern.  $H_2O_2$  ist ab millimolaren Konzentrationen ausschließlich als oxidativer Stress zellschädigend. Im nanomolaren oder auch niedrigen mikromolaren Konzentrationen dienen ROS als *second messenger* und sind an einer Signalweiterleitung beteiligt (Droge and Droge 2002; Wu 2006),



---

wobei zelltypspezifische Toleranzen gelten (Sies 2017). Eine schädliche Wirkung wird den strahleninduzierten ROS zugeschrieben, da sie vor allem die DNA schädigen und dadurch die genomische Integrität gefährden. Im Zytosol hingegen könnten diese ROS als *second messenger* fungieren und verschiedenste Zellprozesse stimulieren.

In dieser Arbeit wird das intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Level in lebenden Jurkat Zellen mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung ermittelt. Ein spezieller experimenteller Aufbau an der GSI in Wixhausen ermöglicht es simultan zu einer Röntgenbestrahlung fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebenden Zellen zu machen, da eine mit einem Mikroskop ausgestattete Röntgenkammer zu Verfügung steht. Der genetisch kodierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Sensor HyPer bietet zusätzlich einige Vorteile gegenüber herkömmlichen ROS Indikatoren. Diese Vorteile liegen in der reversiblen und schnellen Konformationsänderung, dem ratiometrischen Verhalten und der hohen Selektivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Belousov et al. 2006).

Die Etablierung des HyPer Sensors erfolgte in vorherigen Arbeiten (Mishina et al. 2013; Gibhardt et al. 2015). Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass IR in HEK-293 und A549 Zellen das  $\text{H}_2\text{O}_2$  Level direkt nach Bestrahlung erhöht. Das HyPer-Ratio spiegelt das Verhältnis zwischen dem oxidierten und dem reduzierten Zustand des Sensors. Der Anstieg des HyPer Ratios verhält sich proportional zur Dosis (Gibhardt 2014). Bei Dosen von 1 und 10 Gy zeigt sich ein biphasisches Verhalten. Nach Erreichen des Maximums sinkt das HyPer-Ratio durch Puffern der ROS wieder ab. Das  $\text{H}_2\text{O}_2$  Level nach Bestrahlung sollte in dieser Arbeit für Jurkat Zellen charakterisiert werden, da diese Zelllinie zur Familie der Immunzellen gehört und die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf Immunzellen weitestgehend unbekannt sind. Die in Gibhardt et al. 2015 postulierte Signalkaskade könnte in Immunzellen zu weitreichenden Konsequenzen wie Fehlfunktionen oder unspezifischer Aktivierung führen.

---

#### **3.4.2.1 Die intrazelluläre $\text{H}_2\text{O}_2$ Konzentration steigt durch Röntgenstrahlung an**

---

Jurkat Zellen wurden transient mit dem ratiometrischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Sensor HyPer transfiziert. Im Gegensatz zu HEK293 oder auch A549 Zellen lassen sich Jurkat Zellen extrem schwer transfizieren. Dies erklärt auch die niedrige Versuchsanzahl. Die Daten in Abb.13 zeigen, dass die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration von Jurkat Zellen stabil auf einem basalen Level bleibt, solange kein Stimulus gesetzt wird. Die Bestrahlung mit 1 oder 10 Gy Röntgenstrahlung führt zu einem rapiden Anstieg des HyPer Ratios unmittelbar nach Bestrahlung in allen

---

untersuchten Zellen (N= 7) Abb.13, was eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration widerspiegelt. Die Kinetik der Erhöhung des HyPer Ratios verläuft nicht in allen Zellen einheitlich. Die Amplitude des Ratios korreliert weder mit der Dosis, noch ist für die gleiche Dosis ein einheitlicher zeitlicher Verlauf zu erkennen. Die Beispielzelle in Abb.13 zeigt ein biphasisches Verhalten mit Erreichen eines Maximums und einer anschließenden Verringerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration durch zelleigene Puffersysteme. Im gleichen Zeitraum zeigen mehr als 50 % der untersuchten Zellen nicht dieses biphasische Verhalten, sondern ein stetiges Ansteigen des HyPer Ratios.

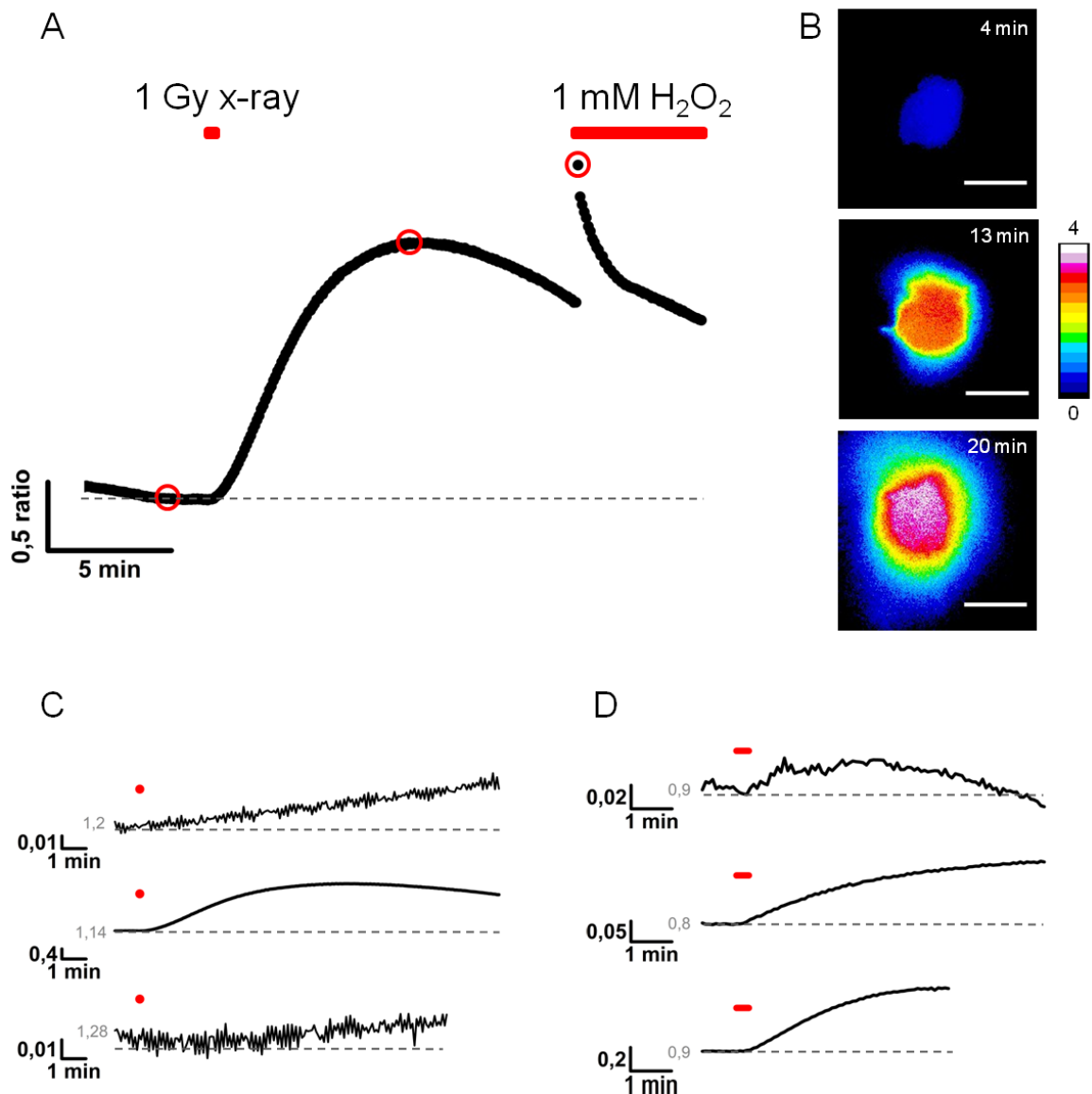


Abbildung 13: Verlauf des HyPer Ratios nach Röntgenbestrahlung

Eine beispielhafte Jurkat Zelle exprimiert den  $H_2O_2$  Sensor HyPer. A) Die Bestrahlung dieser Zelle erhöht das Ratio des  $H_2O_2$  Sensors HyPer direkt nach Bestrahlung über das basale HyPer Level (graue gestrichelte Linie), was einer Erhöhung der intrazellulären  $H_2O_2$  Konzentration entspricht. Nach wenigen Minuten erreicht dieser Anstieg sein Maximum, anschließend verringert sich das Ratio.  $H_2O_2$  wird vermutlich gepuffert. Die Zugabe von externem  $H_2O_2$  führt zur Sättigung des Sensors und damit zum Erreichen des maximalen HyPer Ratios. Die rot umkreisten Datenpunkte aus A) sind in B) als Falschfarbenbilder dargestellt (Skala = 10  $\mu m$ ). Verlauf des HyPer Ratios für drei Zellen nach der Bestrahlung mit 1 Gy C) oder 10 Gy D) Der Zeitpunkt der Bestrahlung ist durch einen roten Punkt C) oder einen roten Balken D) gezeigt.

Die Messungen zeigen, dass ionisierende Strahlung das intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Level in Jurkat Zellen erhöht. Auch nach Ende der Bestrahlung stieg die ROS Konzentration noch weiter an. Sowohl die Kinetik als auch die Amplitude des HyPer Ratios weichen auffällig zwischen einzelnen Zellen voneinander ab. Die Ursache dafür bleibt unbekannt. In dieser Hinsicht unterscheidet sich der strahleninduzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Anstieg in Jurkat Zellen sowohl in Kinetik als auch in der Amplitude von dem was unter gleichen Versuchsbedingungen in HEK293 und A549 Zellen gemessen wurde; in HEK293 Zellen, die mit 1 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt wurden, stieg die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration nur transient für wenige Minuten an und erreichte dann wieder das basale  $\text{H}_2\text{O}_2$  Niveau. Der Anstieg hatte nach 1 Gy für alle untersuchten Zellen eine ähnliche Amplitude. In A549 Zellen korrelierte der Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration nach Bestrahlung mit der Dosis. Nach 10 Gy Röntgenbestrahlung war die Amplitude des HyPer Ratios 10-fach höher als nach 1 Gy Röntgenbestrahlung. 1 Gy und 10 Gy Röntgenbestrahlung induzierten nur einen Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration für wenige Minuten, danach verringerte sich die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration bei allen untersuchten Zellen im Versuchszeitraum von 15 min.

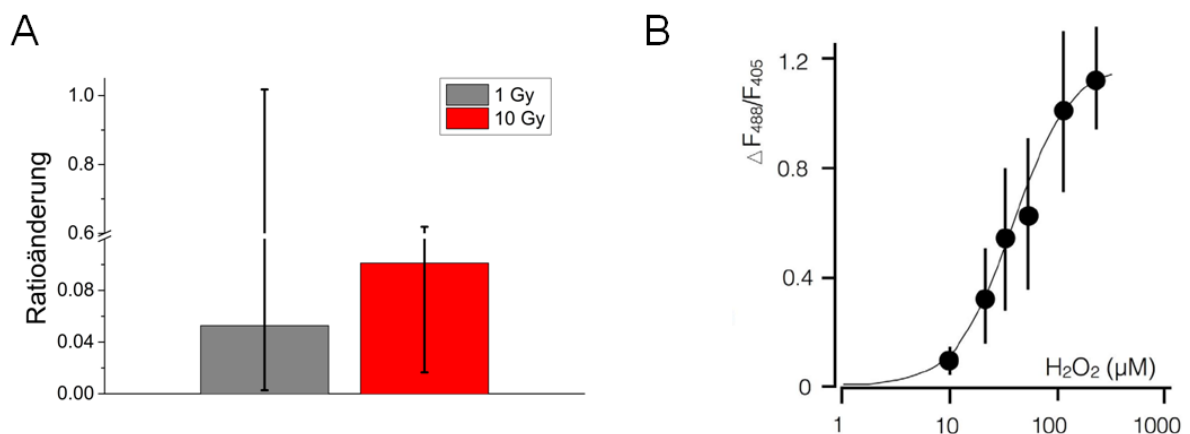


Abbildung 14: HyPer Ratioänderung nach Bestrahlung und externer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe

A) Die mittlere Änderung des HyPer Ratios vor und 5 min nach Bestrahlung der in Abb.13 C und D gezeigten einzelnen Zellen. Es ist das geometrische Mittel samt geometrischem Fehler für jeweils drei Zellen gezeigt. B) Kalibrierung des HyPer Sensors mit extern appliziertem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in HEK293 aus Gibhardt et al. 2015. An Hand dieser Kalibrierung lässt sich eine Aussage darüber treffen mit welchen extern applizierten  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen ein Strahleneffekt imitiert werden kann.

---

Trotz dieser Unterschiede in der zellulären Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Folge von IR zeigen alle Jurkat Zellen einen Anstieg an  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Daher kann vermutet werden, dass der Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration auch folgende Signalschritte wie den ROS induzierten Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  auslösen kann. Die *in vivo* Kalibrierung des HyPer Sensors in HEK293 Zellen (Gibhardt et al. 2015) lässt eine Korrelation des strahleninduzierten Ratioanstiegs mit einer Erhöhung des Ratios durch eine extern applizierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration in Jurkat Zellen zu. Es ergibt sich durch die immensen Differenzen des Ratioanstiegs nach Bestrahlung ein weiter Bereich der Ratioänderung zwischen 0,01 und 1,02 für 1 Gy und zwischen 0,02 und 0,62 für 10 Gy. Dies lässt mit Hilfe der Kalibrierungskurve aus Abb.14 B auf einen weiten Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  extern appliziertem  $\text{H}_2\text{O}_2$  schließen, der den gleichen Ratioanstieg erzeugt wie in den Jurkat Zellen nach Bestrahlung gemessen wurde.

Im nächsten Schritt wird nun überprüft, ob verschiedene extern applizierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  verändern können. Da die Plasmamembran für  $\text{H}_2\text{O}_2$  permeabel ist, sollte eine extrazelluläre Applikation des Peroxids die gleiche Auswirkung haben wie ein Anstieg innerhalb der Zelle.

---

### 3.4.3 Auswirkung von extern appliziertem $\text{H}_2\text{O}_2$ auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

---

In humanen Zellen ist die Aufrechterhaltung der intrazellulären Calciumkonzentration von essentieller Bedeutung. Bereits geringfügige Abweichungen vom basalen Calciumniveau können viele zelluläre Prozesse anstoßen, da Calcium einen universellen *second messenger* in Zellen darstellt. Das spatiotemporale Ausmaß dieser Abweichung kodieren spezifisch, welcher Prozess in Gang gebracht wird. Bei sehr komplexen und dynamischen Calciumänderungen, die in Zellen durch Signale hervorgerufen werden, können sowohl die Frequenz, die Amplitude oder die Kombination beider Faktoren zusammen mit dem Ort und der Zeit als Hauptparameter über die folgende Zellreaktion bestimmen (Smedler and Uhlén 2014).

Als Indikator für eine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  diene in der zellpermeable Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (Gee et al. 2000). Aufgrund des  $K_d$ -Wertes im nanomolaren Bereich (345 nM) und des großen dynamischen Bereichs ist Fluo-4 in der Lage Abweichungen von der homöostatischen Calciumkonzentration, die in ruhenden Zellen bei  $\sim 100$  nM liegt, anzuzeigen.

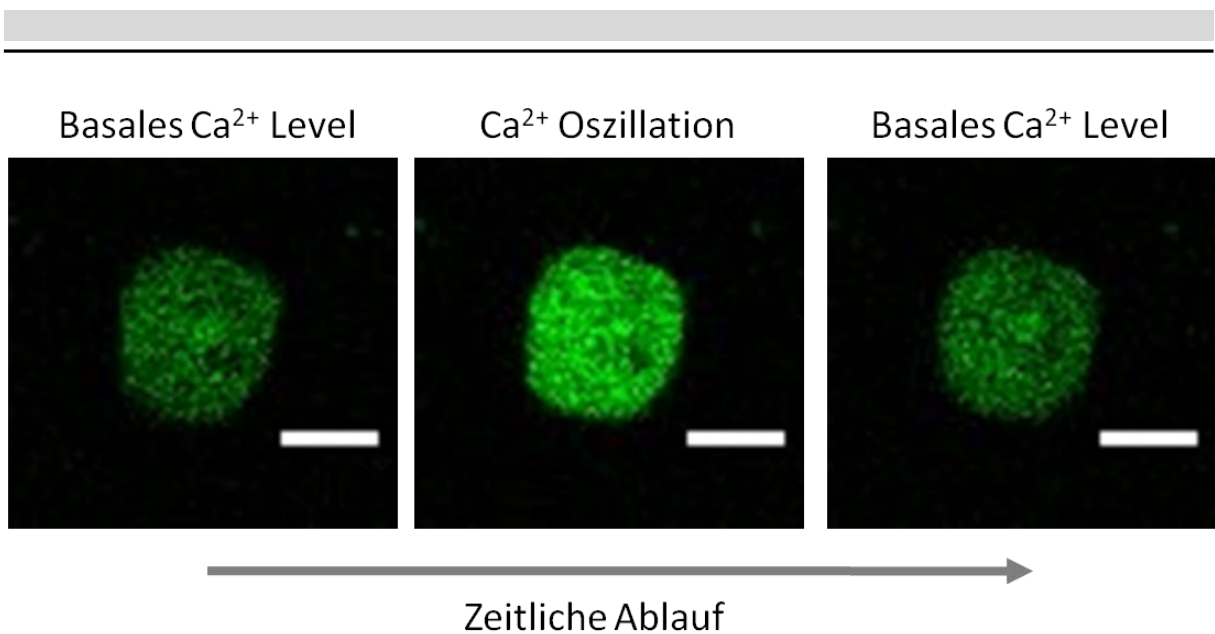


Abbildung 15: Beispielhafte Ablauf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation angezeigt durch den Calciumindikator Fluo-4

Jurkat Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM gefärbt und mikroskopisch analysiert. Es ist der zeitliche Ablauf einer Calciumoszillation gezeigt. Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  vom basalen Calciumlevel (links) wird durch einen Anstieg der Pixelintensitäten sichtbar (mitte). Nach einer Erhöhung kehrt das Calciumniveau wieder zum Ausgangszustand zurück (rechts). Dieser Ablauf ist typisch für einen Prozess, der sich *calcium induced calcium release* (CICR) nennt. Quantifiziert wurde eine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch einen ROI um die Zelle, wodurch die summierten Pixelintensitäten aller aufgenommenen Bilder miteinander verglichen werden konnten

In Abb. 15 ist der beispielhafte Ablauf eines Anstiegs der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  zu erkennen, wie er nach Stimulierung einer Jurkat Zelle prinzipiell ablaufen kann. Das Calciumniveau steigt von einem basalen Level zu einem erhöhten Calciumlevel. Danach wird das Calcium wieder aktiv aus dem Zytosol befördert, wodurch das Calciumlevel wieder zu seinem Ausgangsniveau und die Zelle zu ihrem Ausgangszustand zurückkehrt. Nachdem dieser Prozess abgelaufen ist und die Zelle in ihrem Ruhezustand ist, kann die Zelle jederzeit wieder ihre  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  erhöhen. Eine lokale Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  kann mit dem Calciumindikator Fluo-4 ebenso zuverlässig angezeigt werden wie eine Erhöhung des Calciumlevels der gesamten Zelle wie in Abb.15. Fluo-4 ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert. Veränderungen der Calciumkonzentration in den Organellen oder dem Nukleus können nicht angezeigt werden.

In Abschnitt 3.4.2.1 wurde gezeigt, dass schon 1 Gy Röntgenstrahlung eine messbare Erhöhung der intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration verursacht. Im Hinblick auf die putative Signalkaskade ergibt sich folglich die Frage, ob eine extern applizierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration die

---

$[Ca^{2+}]_{cyt}$  verändern kann. Nach einem Vergleich des HyPer Ratioanstiegs, der durch ionisierende Strahlung erzeugt wird, mit dem HyPer Anstieg, der durch extern appliziertes  $H_2O_2$  verursacht wird (Gibhardt et al. 2015), hat sich ein Konzentrationsbereich von 1  $\mu M$  bis 500  $\mu M$  externem  $H_2O_2$  ergeben um den strahleninduzierten Ratioanstieg nachzuahmen. In den Experimenten zur Untersuchung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nach  $H_2O_2$  Behandlung wurden die Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu M$   $H_2O_2$  extern appliziert. Diese Konzentrationen bedingen einen 100 -500 fach geringeren Anstieg der internen  $H_2O_2$  Konzentration (Sies 2017). Um die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  mit dem qualitativen Farbstoff Fluo-4 auch quantitativ vergleichbarer zu machen, wurden 5 min vor Ende jeder Messung das Calciumionophor Ionomycin zum Außenmedium der Zellen gegeben. Diese Zugabe erhöht die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  bis hin zu einem Maximalwert, der durch die Sättigung des Farbstoffs vorgegeben ist. Für jede Messung wurden der Minimalwert auf 0 und der Maximalwert auf 1 normiert. Insofern sollte die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  unterschiedlicher Messungen nach der gleichen Behandlung in einer ähnlichen Größenordnung bleiben und verschieden starke Stimuli vergleichbar machen.

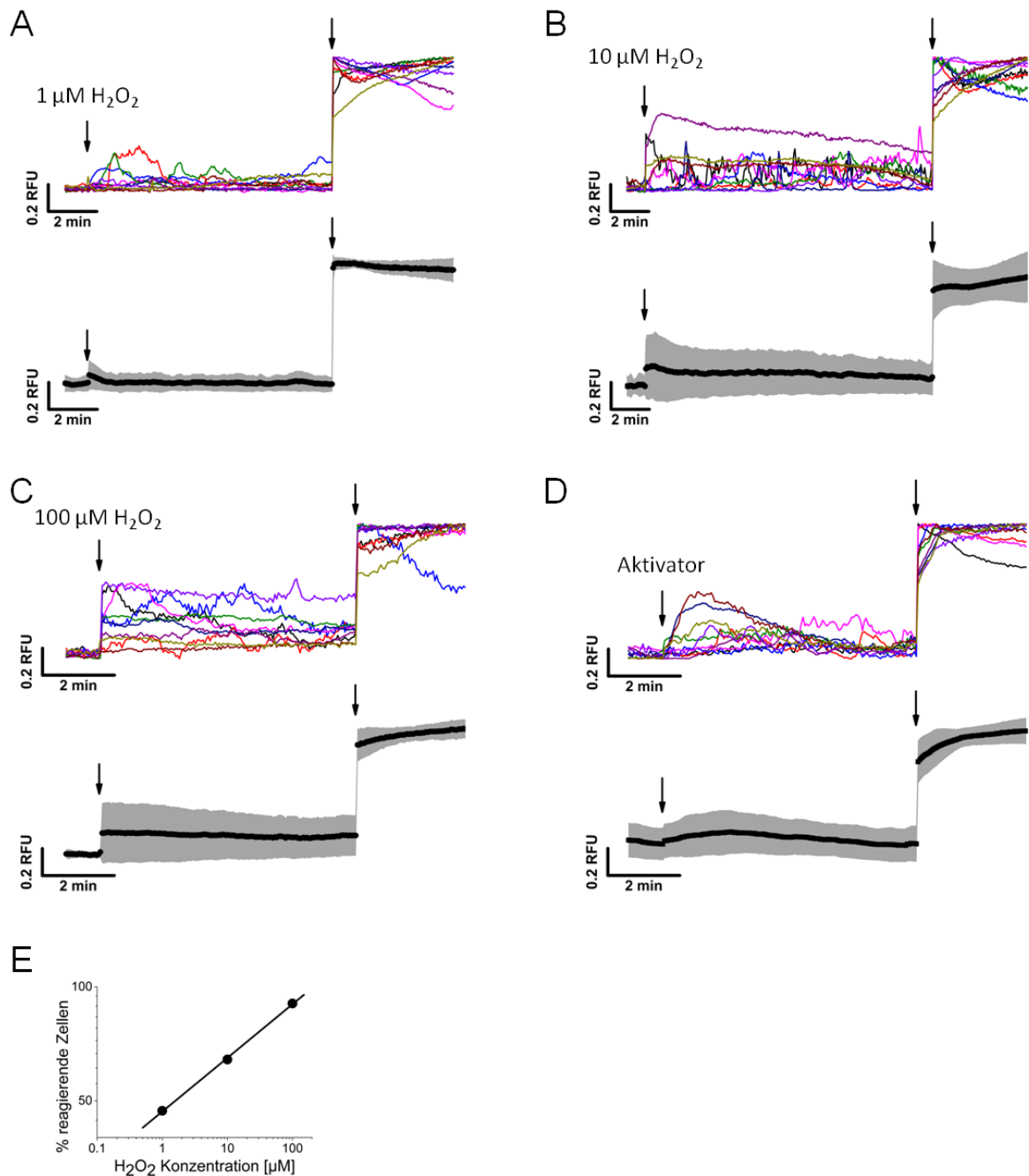


Abbildung 16: Extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöht die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

Die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von Jurkat Zellen wurde mit dem Calciumindikator Fluo-4 mikroskopisch analysiert. Nach Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  A),  $10 \mu\text{M}$  B) oder  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  C) ist die Fluo-4 Emission von 10 exemplarischen Zellen, die eine Reaktion auf die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gezeigt haben als Einzelspur gezeigt (jeweils oben). Zusätzlich ist der Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) der Fluo-4 Emission von allen untersuchten Zellen dargestellt (jeweils unten). In D) ist die Fluo-4 Emission nach Zugabe eines CD3/CD28/CD2 Antikörpermix (Aktivator) gezeigt, ebenfalls an Hand von 10 exemplarischen Einzelspuren und als Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung). In E) ist der Anteil der Jurkat Zellen gezeigt, die auf die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren. Die Auftragung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration auf der X-Achse erfolgte logarithmisch, wodurch ein Linearer Zusammenhang erkennbar wird.



---

Die exemplarischen Daten in Abb.16 zeigen, dass die Zellen auf jede extern applizierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration sehr unterschiedlich reagieren. Während manche Zellen keine Reaktion auf extrazelluläres  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigen, reagieren andere mit einer transienten Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Die Daten zeigen ferner einen klaren Trend: Je höher die  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration desto höher ist nicht nur der Anteil an Zellen, die eine Reaktion zeigen, sondern auch die Amplitude und die Dauer der erhöhten  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ . Während 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einem zeitlich unkoordinierten transienten Calciumanstieg führt, halten 10 und 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  die Calciumkonzentration bei einem größeren Anteil der Zellen andauernd auf einem vom basalen Niveau erhöhten Level. Dies zeigt sich auch deutlich, wenn die Mittelwerte aller beobachteter Zellen samt Standardabweichung dargestellt werden (Abb.16). Im Vergleich zu 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erkennt man nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine dauerhaft erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .

Die Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  nach externer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe ist ein indirekter Nachweis für eine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  nach Röntgenbestrahlung. ROS entstehen nach Röntgenbestrahlung direkt dort, wo sie auch auf die Zellfunktion einwirken können. Zudem ist die genaue interne  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration nach externer Zugabe unklar und muss nicht für alle Zellorganellen gleich sein. Deshalb wird im nächsten Schritt die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  während der Bestrahlung gemessen.

---

#### **3.4.4 Auswirkungen IR auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$**

---

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass IR eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration erzeugt und ferner die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  von Jurkat Zellen sensitiv auf extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert, sollte nun die direkte Auswirkung von ionisierender Strahlung auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  untersucht. Diese Experimente wurden wie in 3.4.2.1 am gleichen speziell angefertigten Mikroskop zur Untersuchung lebender Zellen nach Bestrahlung durchgeführt.

Weder die Bestrahlung mit 1 Gy noch die Bestrahlung mit 10 Gy führten jedoch innerhalb von 15 min nach der Bestrahlung zu einem messbaren Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  (Abb.17). Die Zellen reagierten auf die Zugabe von Ionomycin mit einer deutlichen Erhöhung des Calciumlevels, was dafür spricht, dass das Messsystem funktionell ist. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen nicht in der Lage waren auf die Strahlung zu reagieren. Vielmehr scheint die Calciumkonzentration von Jurkat Zellen insensitiv gegenüber IR innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung zu sein.

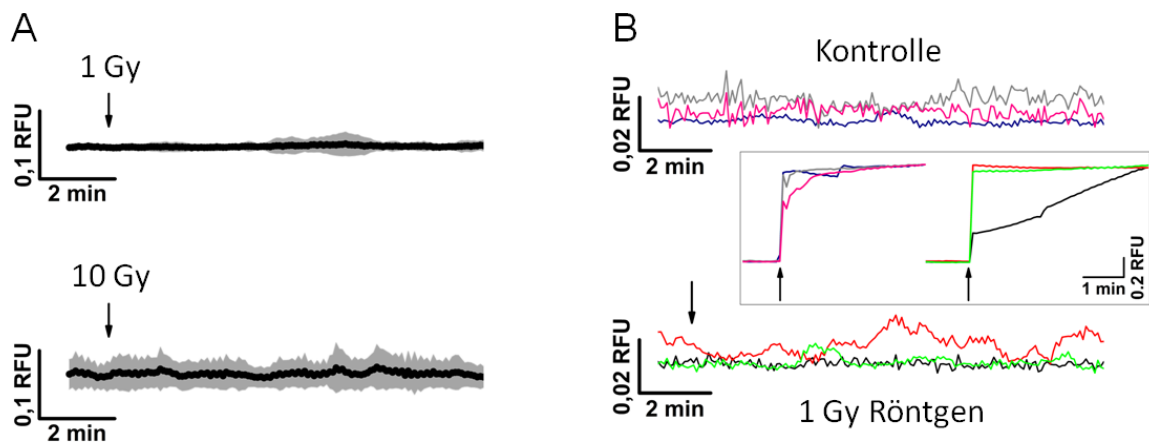


Abbildung 17:  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nach Röntgenbestrahlung

Jurkat Zellen wurden mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM beladen. Eine Bestrahlung mit 1 Gy A) (oben) oder 10 Gy A) (unten) veränderte das basale Calciumniveau innerhalb von 15 min nach Bestrahlung nicht (1 Gy n = 3, 27 Zellen; 10 Gy n = 3, 24 Zellen). B) 3 exemplarische Zellen sind über einen Zeitraum von 15 min nach 1 Gy Röntgenbestrahlung gezeigt. Im Kasten ist die Ionomycinbehandlung gezeigt, auf die die gleichen Zellen am Ende einer Messung reagiert haben.

Innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung kann keine Abweichung vom basalen Calciumniveau registriert werden. In vorherigen Arbeiten wurden anstelle von Jurkat Zellen A549 Zellen zur Charakterisierung einer Signalkaskade verwendet. In A549 Zellen wurde gezeigt, dass ionisierende Strahlung einen Calcium-abhängigen Kaliumkanal unmittelbar nach Bestrahlung aktiviert. Wurde das Calcium mit einem Chelator abgefangen, zeigt dieser Kanal nach Bestrahlung keine Aktivität. Die Signalkaskade über IR, ROS und Calcium wurde als Ursache vermutet. Das Calciumlevel innerhalb der Zellen wurde in diesen Arbeiten nicht direkt nach Bestrahlung gemessen. In A549 Zellen wird wie in Jurkat Zellen eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nach IR vermutet. Aber auch in A549 Zellen hatte die Bestrahlung keinen Einfluss auf die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  innerhalb von wenigen Minuten nach Bestrahlung (Daten nicht gezeigt). Diese Daten stehen in Einklang zu Veröffentlichungen, die sich mit der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  nach Bestrahlung in weitem Zelltypen beschäftigt haben (Hallahan et al. 1994; Du et al. 2008). Die Daten aus Abb.11 zeigen, dass eine strahleninduzierte Vergrößerung durch BAPTA-AM verhindert werden kann, was dafür spricht, dass Calcium in der Signalkette eine Rolle spielt. Die Abwesenheit eines messbaren Calciumsignals unmittelbar nach Bestrahlung spricht in diesem Zusammenhang dafür, dass Calcium möglicherweise nicht an der frühen zellulären Antwort, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung eine Signalfunktion erfüllt.

---

### 3.5 Einfluss des G2-Arrest auf die Vergrößerung

---

Das Verhältnis von Nucleus zum gesamten Zellkorpus liegt in Jurkat Zellen bei  $55 \% \pm 8 \%$  (Rosenbluth et al. 2006). Im G2-Zellzyklus liegt der doppelte DNA Gehalt im Vergleich zum G1-Zyklus vor und auch die Zellmasse muss vor der Teilung zunehmen. Daher sollten Jurkat Zellen in G2 größer als in der G1-Phase sein. Ein strahlenbedingter G2-Zellzyklusarrest könnte eine Vergrößerung bewirken.

In Abb.18 D ist zu erkennen, dass unbestrahlte Kontrollzellen fast ausschließlich kleiner als  $13 \mu\text{m}$  sind, obwohl sich 15 % der Zellen im G2-Zyklus befinden. Zellen in der G2-Phase vergrößern ihren Durchmesser folglich nicht über  $12 \mu\text{m}$ . Da in bestrahlten Zellen Zelldurchmesser größer oder gleich  $13 \mu\text{m}$  vorkommen, wird vermutet, dass ein G2-Zellzyklusarrest nur einen Teil zur Vergrößerung beitragen zu kann.

In Abb.18 A ist der Anteil der G2-Phase Zellen an der gesamten Zellpopulation für mehrere Strahlendosen gezeigt (Experimente durchgeführt von P.Voos). Es ist ein deutlicher proportionaler Zusammenhang zwischen Bestrahlung und einer Zunahme der im G2-Zyklus befindlichen Zellen zu erkennen. Je höher die Dosis, desto mehr Zellen befinden sich auch im G2-Zyklus. Der G1-Arrest wird in Jurkat Zellen nicht effektiv initiiert. Die Zunahme des Anteils der Zellen in der G2-Phase korreliert sogar mit der Größenzunahme nach Bestrahlung, da beide im gleichen Dosisbereich ähnlich stark zunehmen und bei ähnlichen Dosen sättigen. Aus diesem Grund könnte ein G2-Arrest zur strahleninduzierten Vergrößerung beitragen.

Ein nicht strahleninduzierter G2-Arrest sollte Aufschluss über eine Zellzyklusarrest bedingte Vergrößerung geben. Mit dem Mitosehemmstoff Demecolcin wurden Jurkat Zellen dazu ohne Bestrahlung im G2-Zyklus arretiert. Wäre ein G2-Arrest an der Vergrößerung beteiligt, sollten sich die Jurkat Zellen 48 h nach Behandlung vergrößern. Die Daten in Abb.18 B zeigen jedoch, dass die Behandlung von Jurkat Zellen mit Demecolcin zu keiner Vergrößerung führt. Demecolcin verhindert die Ausbildung der Spindelfasern während der Mitose, greift dementsprechend sehr spät in die Mitose ein und verhindert nicht das Kondensieren der DNA. Das könnte ein möglicher Grund sein, warum sich die Demecolcinbehandlung nicht auf den Zelldurchmesser der Jurkat Zellen auswirkt. Deshalb wurden die Jurkat Zellen mit dem CDK1-Inhibitor RO3306 (Experimente durchgeführt von P.Voos) behandelt, der sehr effizient einen G2-Zellzyklusarrest induziert, ohne eine Kondensation der Chromosomen zu bewirken.  $3 \mu\text{M}$  RO3306 arretierten 71 % der untersuchten Zellen in der G2-Phase. Dieser Arrest bewirkte

---

eine Vergrößerung von  $11,3 \% \pm 5 \%$ . Im Vergleich dazu arretierte die Bestrahlung mit 5 Gy einen ähnlichen Prozentsatz an Zellen in der G2-Phase ( $76,3 \% \pm 6 \%$ ), die Vergrößerung ist nach 5 Gy mit  $21,22 \% \pm 2,34 \%$  aber deutlich stärker. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Zellzyklusarrest nicht allein für die Vergrößerung der Zellen verantwortlich sein kann, aber zu einem Teil der Vergrößerung beiträgt.

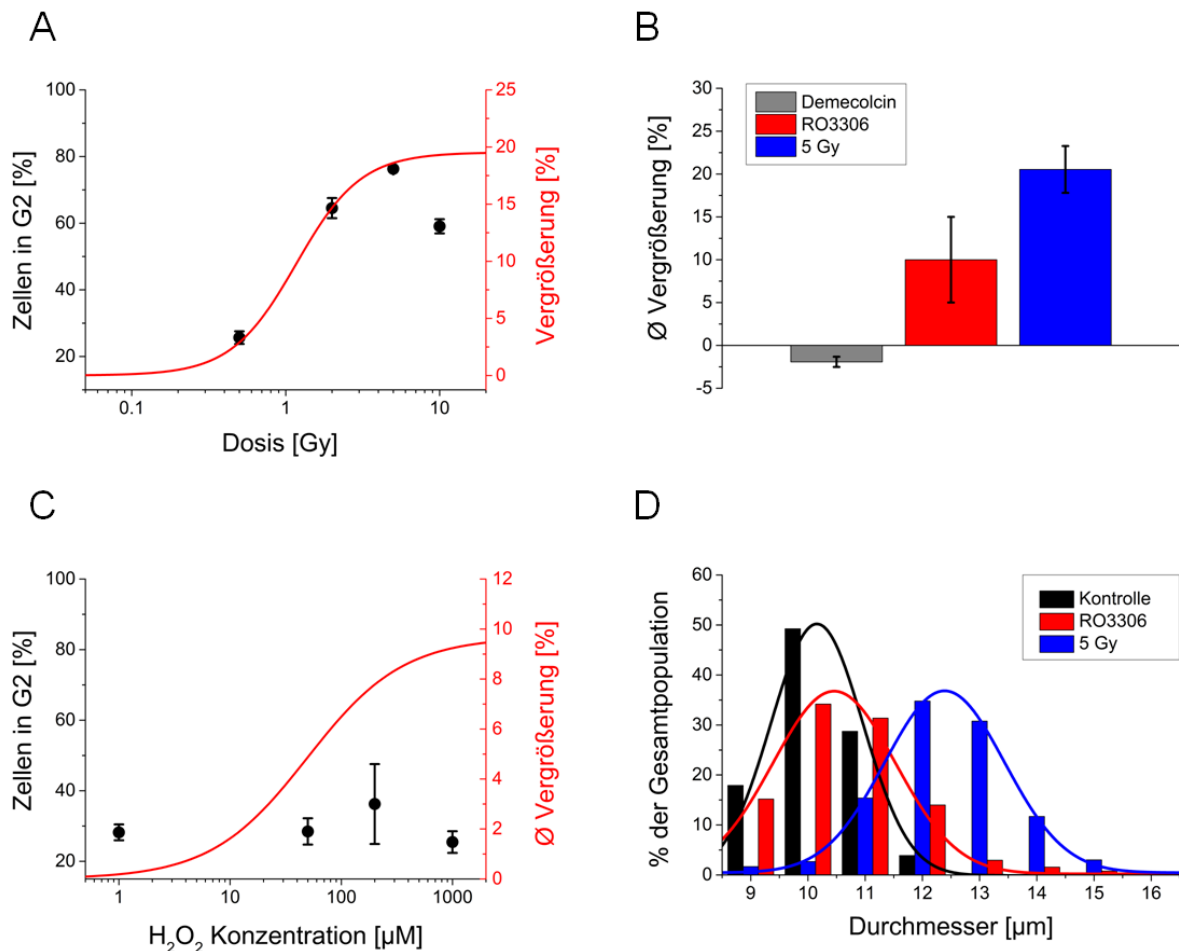


Abbildung 18: Einfluss des G2-Zellzyklusarrests auf die Durchmesserervergrößerung

A) Der Anteil der Jurkat Zellen im G2-Zyklus wurde 48 h nach Bestrahlung mittels FACS und einer Propidiumiodidfärbung ermittelt (schwarz; Experimente durchgeführt von P. Voos). Mit steigender Dosis erhöht sich der Anteil, der im G2-Zyklus arretierten Jurkat Zellen. Dieser Anstieg korreliert mit der strahleninduzierten Durchmesserervergrößerung, die als Hill-Fit aus Abb.11 C angedeutet ist. B) Die Zelldurchmesserervergrößerung wurde 48 h nach Behandlung/ Bestrahlung mikroskopisch automatisiert bestimmt. Die chemische Arretierung der Jurkat Zellen im G2-Zyklus bewirkt für Demecolcin (blau) keine Durchmesserervergrößerung, für den CDK1 Inhibitor RO3306 (rot) hingegen schon. Mit 5 Gy Röntgenstrahlung werden prozentual genauso viele Zellen im G2-Zyklus arretiert wie nach der Behandlung mit RO3306, die Zellen vergrößern sich jedoch doppelt so stark (blau). C) Anteil der Zellen im G2-Zyklus abhängig von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration (schwarz, Experimente durchgeführt von P.Voos). In rot ist der Hill-Fit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Durchmesserervergrößerung aus Abb.11 B gezeigt (Standardabweichung  $n \geq 3$ ). D) Vergleich der Größenverteilung zwischen unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle), dem CDK1 Inhibitor RO3306 und 5 Gy bestrahlten Zellen 48 h nach der Behandlung/ Bestrahlung. Zur Verdeutlichung der Größenverteilung wurden die Daten mit der Gaussverteilung gefittet.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Durchmesserervergrößerung und die Zellzyklusarrest bedingte Vergrößerung, könnten im Zusammenspiel die strahleninduzierte Vergrößerung herbeiführen. Eine Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt über 48 h zu einer Vergrößerung der Jurkat Zellen 48 h um

---

10 %. Die gleiche Vergrößerung bewirkt die Arretierung der Jurkat Zellen im G2-Zyklus durch RO3306. Die maximale strahleninduzierte Vergrößerung ( $\sim 20$  %) würde sich demnach aus der Summe der beiden Anteile ergeben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Jurkat Zellen mit  $H_2O_2$  im Außenmedium behandelt. Falls die oben genannte Hypothese zutrifft, dürfte keine der eingesetzte  $H_2O_2$  Konzentration den Zellzyklus beeinflussen. In Abb.18 C ist der Anteil an Zellen im G2-Zyklus gegen die  $H_2O_2$  Konzentration im Medium aufgetragen. Der G2-Zyklusanteil bleibt über alle untersuchten Konzentrationen hinweg konstant;  $H_2O_2$  hat demnach keinen Einfluss auf die Arretierung im G2-Zyklus, trotzdem nimmt die Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen ab, da die Zellen durch den vermehrten oxidativen Stress apoptotisch werden.

Die durch den G2-Zellzyklusarrest hervorgerufene Vergrößerung sollte nur durch Zellen mit einem Durchmesser kleiner oder gleich  $12\ \mu m$  hervorgerufen werden, da in unbehandelten Kontrollzellen nahezu keine Zellen größer als  $12\ \mu m$  sind, aber sich trotzdem 15-20 % der Zellpopulation im G2-Zyklus befindet. Jurkat Zellen in der G2-Phase sollten einen Durchmesser von 11 oder  $12\ \mu m$  haben, da diese in der G2-Phase größer als in den übrigen Zellzyklusphasen sind. Eine Arretierung im Zellzyklus sollte folglich dazu führen, dass vermehrt Zellen in den Größenklassen 11 und  $12\ \mu m$  auftreten. In Abb.16 D ist die Zellgrößenverteilung 48 h nach Behandlung mit dem CDK1 Inhibitor RO3306 und die Größenverteilung nach 5 Gy Röntgenbestrahlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen gezeigt. RO3306 erhöht den Anteil der Zellen mit einem Durchmesser von  $11\ \mu m$  nicht nur im Vergleich zur Kontrolle, sondern auch im Vergleich zu 5 Gy bestrahlten Zellen. Auch der Anteil der Zellen mit  $12\ \mu m$  Durchmesser steigt nach Behandlung mit RO3306 im Vergleich zur Kontrolle an, jedoch bewirkt eine Bestrahlung mit 5 Gy eine stärkere Zunahme dieser Größenklasse. Diese Daten stimmen insofern mit der Hypothese überein, dass eine strahleninduzierte Vergrößerung zu 50 % durch einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase und der damit verbundenen Größenzunahme bedingt wird. Die restlichen 50 % der Größenzunahme werden dagegen von  $H_2O_2$  über einen weiteren Signalweg induziert.

$H_2O_2$  und ionisierende Strahlung verursachen Schäden an der DNA. Zu den Schäden werden Reparaturproteine rekrutiert, um diese zu reparieren und die Integrität der Zellinformation zu gewährleisten. Welchen Einfluss DNA Reparaturproteine auf die Vergrößerung haben, wird im nächsten Abschnitt untersucht.

---

### 3.6 DNA Reparatur und strahleninduzierte Vergrößerung

---

Ionisierende Strahlung ist in der Lage Proteine zu schädigen oder die DNA-Doppelhelix zu brechen, wodurch Einzelstrangbrüche (single-strand break = SSB) oder auch Doppelstrangbrüche (Doppelstrangbruch = DSB, -brüche = DSBs) entstehen. Ein DSB wird als schwerwiegendster Schaden nach Bestrahlung eingestuft (Khanna and Jackson 2001; Jackson and Bartek 2009). An der Reparatur dieser Schäden sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, die neben der Reparatur auch noch weitere Signalwege wie einen Zellzyklusarrest in Gang setzen können.

In der bisherigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei Signalkaskaden zu jeweils ungefähr 50 % zur Vergrößerung beitragen. Der Ursprung der Signalkaskaden ist ungeklärt. Wenn beide Signalkaskaden auf DSB-Reparaturproteine zurückzuführen wären, sollte eine Vergrößerung auch eintreten, wenn die DSBs chemisch und ohne Bestrahlung erzeugt werden. Um diese Hypothese zu prüfen wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Chemikalien behandelt. Neocarzinostatin (NCS) induziert unabhängig vom Zellzyklus DSBs und Etoposid erzeugt durch Inhibition der Topoisomerase II nur in der S- und G2-Phase DSBs. Eine NCS Behandlung führt konzentrationsabhängig zu einer Vergrößerung, die in ihrem Verlauf der strahleninduzierten Vergrößerung sehr ähnlich sieht (Abb.19 A). Eine Konzentration von 200 ng/ml NCS vergrößert Jurkat Zellen 48 h nach Behandlung um  $22,32 \% \pm 1,66 \%$ . Ein deutlicher konzentrationsabhängiger Verlauf ist dagegen für Etoposid behandelte Zellen nicht zu erkennen. Die Vergrößerung 48 h nach Behandlung mit  $20 \mu\text{M}$  Etoposid liegt bei  $22,4 \% \pm 5,96 \%$ . Die Etoposid und die NCS Behandlung erreichen Vergrößerungen, die knapp über der Vergrößerung der Zellen liegt, die nach Bestrahlung mit 5 Gy beobachtet wurde ( $20,54 \% \pm 2,73 \%$ ). Die Viabilität der Zellen verringert sich nach Behandlung mit  $20 \mu\text{M}$  Etoposid ( $54,06 \% \pm 9,34 \%$ ) oder 200 ng/ml NCS ( $51,05 \% \pm 3,22 \%$ ) stärker als nach Bestrahlung mit 5 Gy ( $79,8 \% \pm 2,19 \%$ ). In höheren Konzentrationen verringern Etoposid und NCS die Viabilität der Zellen noch stärker, was einen Abfall der Vergrößerung bei hohen Konzentrationen erklärt.

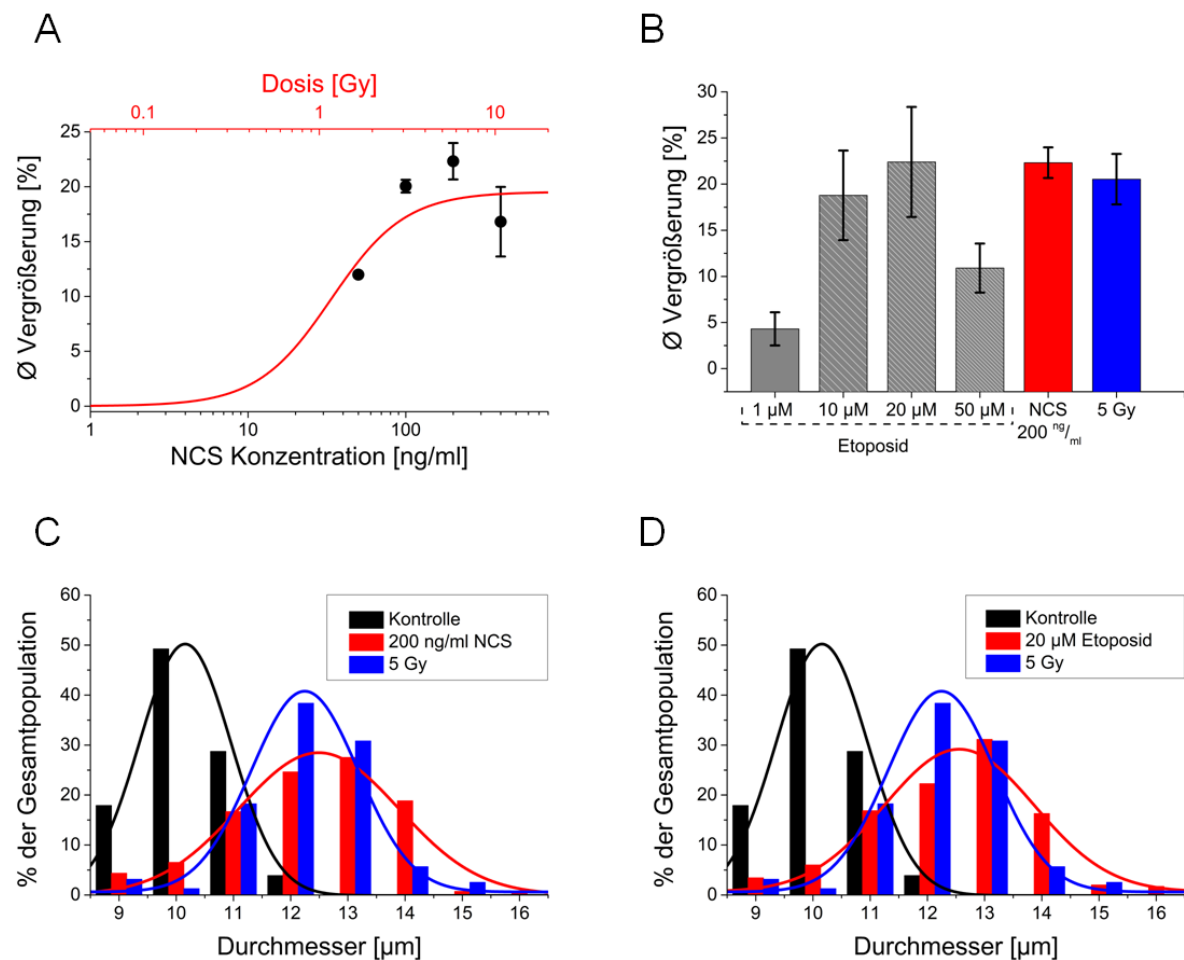


Abbildung 19: DSBs verursachen Zelldurchmesserergrößerung in Jurkat Zellen

A) Durchmesserergrößerung 48 h nach Bestrahlung mit verschiedenen NCS Konzentrationen (schwarz). In rot ist ein Hill-Fit für der Strahleninduzierten Vergrößerung aus Abb.11 C zum Vergleich gezeigt. B) Etoposid bewirkt 48 h nach Behandlung dosisabhängig eine Durchmesserergrößerung, die vergleichbar mit 200 ng/ml NCS oder 5 Gy Bestrahlung ist. Die Größenverteilung 48 h nach einer Behandlung mit Etoposid C) oder 200 ng/ml NCS D) ist im Vergleich zu der Verteilung von unbehandelten Kontrollzellen oder 5 Gy bestrahlten Zellen gezeigt. Zu Verdeutlichung des Verlaufs wurden die Verteilungen mit der Gaussfunktion gefittet. (Mw.  $\pm$  Stabw. von  $\geq 3$  unabhängigen Experimenten; Signifikanztest durch Student'schen t-test \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die Größenverteilung für 200 ng/ ml NCS und 20 µM Etoposid 48 h nach Behandlung sind im Vergleich zur Kontrolle und 5 Gy bestrahlten Zellen in Abb.19 C und D gezeigt. Die Verteilung der NCS und der Etoposid behandelten Zellen ist bemerkenswerterweise sehr ähnlich aufgeteilt. Etoposid induziert nur DSBs in S- und G2-Phase. Zellen in der G1-Phase werden dementsprechend nicht mit DSBs geschädigt und sollten, falls die DSBs die Ursache für eine Vergrößerung wären, ihren Zelldurchmesser nicht verändern. Es sollten sich zwei Populationen ergeben. Zellen ohne DSBs in G1- sollten die Größe von Kontrollzellen behalten,



---

Zellen in der S- und G2-Phase sollte sich ähnlich zu bestrahlten Zellen vergrößern. In Abb.19 D ist eine klare Verschiebung zu größeren Zelldurchmessern zu beobachten. Durchmesser, die in der Kontrollpopulation stark vertreten sind, haben nach Etoposid Behandlung nur noch einen geringen Anteil an der Gesamtpopulation. Zwei Populationen, wie sie durch DSB geschädigte und ungeschädigte Zellen vermutet wurden, sind nicht zu erkennen. Aus den Daten ergibt sich der Schluss, dass eine Vergrößerung nicht ausschließlich auf den DSBs beruhen kann, da Zellen ohne oder mit wenigen DSBs sich ebenfalls vergrößern.

Die Induktion von DSBs durch ionisierende Strahlung oder Chemikalien bewirkt eine effektive Arretierung der Zellen in der G2-Phase. 50 % der Vergrößerung können demnach auf DNA Schäden wie DSBs und den daraus resultierenden G2-Arrest zurückgeführt werden. Die Interpretation steht im Gegensatz zu der Beobachtung, dass auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine Zellvergrößerung bewirkt.  $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugt laut Literatur in den eingesetzten Konzentrationen nur sehr wenige DSBs und arretiert die Jurkat Zellen in diesen Konzentrationen nicht im G2-Zyklus. Etoposid sollte nur in der S- oder G2-Phase DSBs erzeugen, trotzdem wird die gleiche Vergrößerung und gleiche Größenverteilung wie nach 200 ng/ml NCS oder 5 Gy Bestrahlung erreicht. Zusammengefasst unterstützen diese Daten nicht die Hypothese, dass DSBs eine zentrale Funktion bei der Zellvergrößerung von Jurkat Zellen spielen. Um diese Widersprüche genauer zu untersuchen und die Rolle der DSBs für die Vergrößerung aufzuklären, wurden DSBs, die durch verschiedene Behandlungen erzeugt wurden, anhand von DSB Markern quantifiziert.

53 BP1 dient als Marker für DSBs, da das Reparaturprotein innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung zum Bruch rekrutiert wird (Schultz et al. 2000; Rappold et al. 2001). Eine Antikörperfärbung gegen 53 BP1 30 min nach Bestrahlung von Jurkat Zellen mit 1 Gy, der Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  oder 20  $\mu\text{M}$  Etoposid sollte Aufschluss über die Anzahl an erzeugten DSBs geben und einen Schluss auf den Einfluss der DSBs für eine Vergrößerung zulassen (Abb. 20).

Unbehandelte Jurkat Zellen haben im Mittel  $1,65 \pm 2,77$  Foci pro Zelle. Nach einer 10 minütigen Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöht sich die Zahl der Foci pro Zelle auf  $5,01 \pm 4,14$ . Eine ähnliche Anzahl an Foci pro Zelle ist nach einer 1 stündigen Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  Etoposid zu beobachten ( $6,20 \pm 7,26$ ). Die große Varianz der mit Etoposid behandelten Zellen ergibt sich aus zwei Populationen. Zellen in der G1-Phase werden von Etoposid nicht

geschädigt. Es entstehen keine DSBs, daher zeigt ein großer Teil der Zellen ein Focilevel, das dem unbehandelten Kontrollzellen entspricht. Zellen in der S- und G2-Phase zeigen deutlich höhere Focizahlen, da Etoposid in diesen Phasen schädigend wirkt. Im Mittel die höchste Anzahl an Foci pro Zelle wurde nach der Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung registriert ( $23,64 \pm 7,43$ ). Dieser Wert stimmt mit Literaturwerten zur Induktion von DSBs nach Röntgenbestrahlung überein (Löbrich et al. 2010; Antonelli et al. 2015).

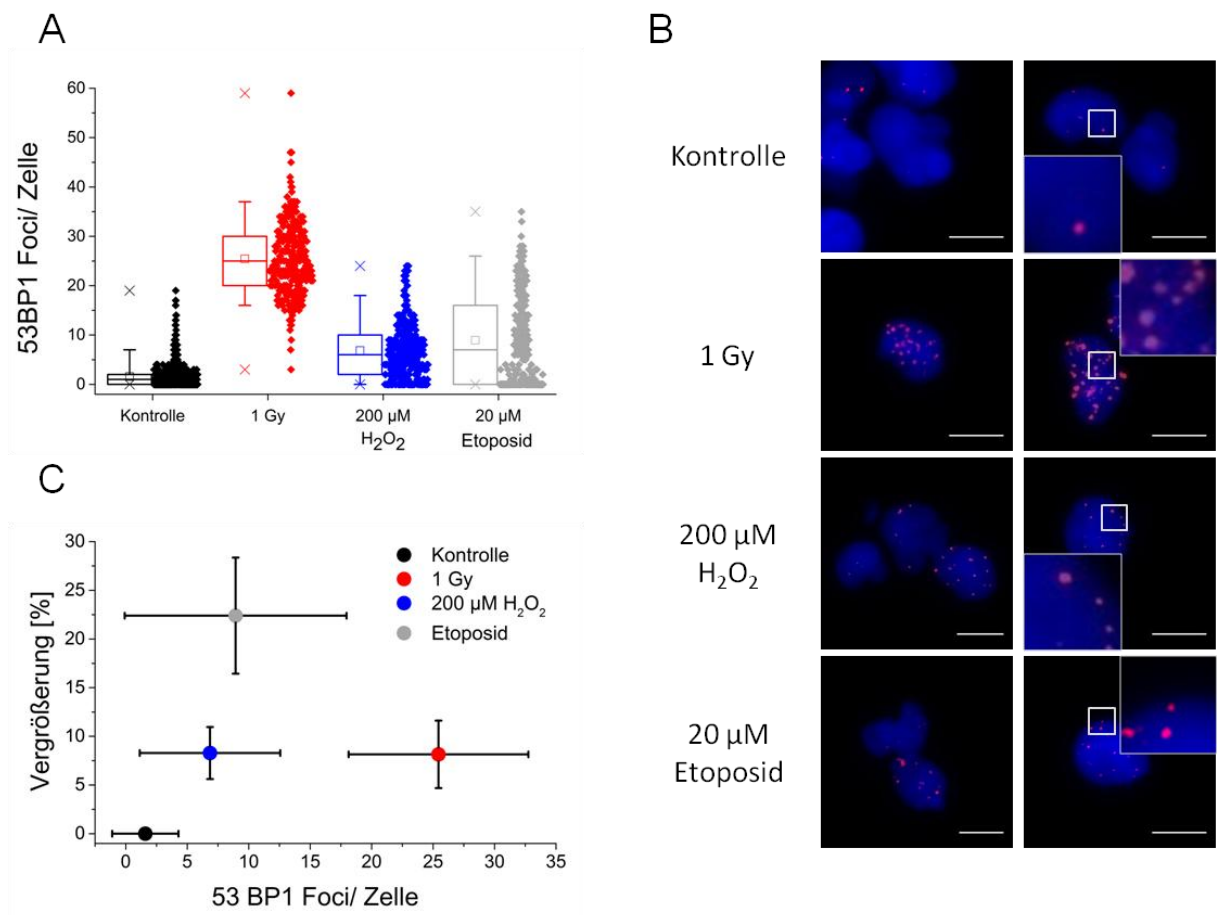


Abbildung 20: 53BP1 Foci in Jurkat Zellen

A) Immunfluoreszenzfärbungen gegen 53BP1 30 min nach den angegebenen Behandlungen. 53BP1 Foci wurden in zufällig ausgewählten Zellen manuell gezählt. Ein Boxplot verdeutlicht die Verteilung (Kontrolle n=11, 641 Zellen; 1 Gy n=5, 270; 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n=5, 303; 20 µM Etoposid n=5, 248). B) Beispielbilder der 53BP1 Immunfluoreszenzfärbung aus A). In blau dargestellt ist der Nukleus in rot die 53BP1 Foci. (Größenstandard 10 µm). Das graue Quadrat im rechten Bild zeigt einen Bereich an, der vergrößert in der rechten oberen oder linken unteren Ecke des Bildes dargestellt ist. C) Die Vergrößerung, die die jeweilige Behandlung aus A) über 48 h bewirkt ist gegen die mittlere 53 BP1 Focianzahl aufgetragen.

---

Aus diesen Daten wird deutlich, dass die Vergrößerung der Jurkat Zellen nicht allein auf die Induktion an DSBs zurückgeführt werden kann. 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  erzeugen 30 min nach Behandlung mit durchschnittlich 5 Foci pro Zelle nur eine geringfügig erhöhte Focizahl im Vergleich zu Kontrolle, trotzdem vergrößern sich die Jurkat Zellen mit ungefähr 8% genauso stark wie nach 1 Gy Röntgenbestrahlung, obwohl diese Dosis eine deutlich höhere Anzahl an DSBs induziert.

Ionisierende Strahlung, Etoposid und NCS erzeugen nicht nur DSBs, sondern auch eine große Anzahl an SSBs (Dahm-Daphi et al. 2000; Ismail et al. 2005; Muslimović et al. 2009; Löbrich et al. 2010). Vor allem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist dafür bekannt viele SSBs, aber nur wenige DSBs zu erzeugen. Daher wird ein Zusammenhang zwischen SSBs und der Vergrößerung der Jurkat Zellen vermutet. ATR (*ATM- and RAD3-related*) ist nicht ausschließlich für die Reparatur von DSBs verantwortlich, sondern erkennt und repariert auch einzelsträngige DNA Bereiche und kann zusätzlich einen Zellzyklusarrest induzieren (Iliakis et al. 2003; Maréchal and Zou 2013). Beide Signalwege zur Vergrößerung könnten durch ATR induziert werden. Sollte ein Zusammenhang zwischen SSBs und der Vergrößerung bestehen, müsste durch die Inhibition von ATR eine Vergrößerung verhindert werden.

Neben ATR wurde auch die Funktion von DNA-PK, ATM und PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*) inhibiert um einen Zusammenhang mit anderen DSB Reparaturproteinen und der Zellvergrößerung auszuschließen. Die Daten in Abb.21 A zeigen, dass die Inhibition von ATR die strahleninduzierte Vergrößerung vollends unterdrückt. Die Inhibition von DNA-PK, ATM oder PARP hatte hingegen keinen reduzierenden Einfluss auf die Vergrößerung. Der ATM Inhibitor verstärkte die strahleninduzierte Vergrößerung sogar.

Die Bestrahlung von Jurkat Zellen mit 2 Gy arretiert die Zellen effektiv im Zellzyklus, wodurch eine weitere Proliferation gehemmt wird. Keine bisherige Behandlung, die die strahleninduzierte Vergrößerung beeinflussen konnte, hatte einen Einfluss auf die Proliferation. Die Inhibition von ATR förderte die Proliferation, trotz einer Bestrahlung mit 2 Gy (Abb.21 B). Ein Zellzyklusarrest scheint durch die Inhibition von ATR früher aufgehoben zu werden oder kann nicht effektiv initiiert werden. Die Inhibition von DNA-PK oder PARP verringerte die Zellzahl zusätzlich im Vergleich zu einer alleinigen Bestrahlung mit 2 Gy. Da die strahleninduzierten DSBs nicht mehr effektiv repariert werden und über eine längeren

Zeitraum persistieren, wird der Zellzyklusarrest verstärkt und die Mortalität der Jurkat Zellen erhöht sich.

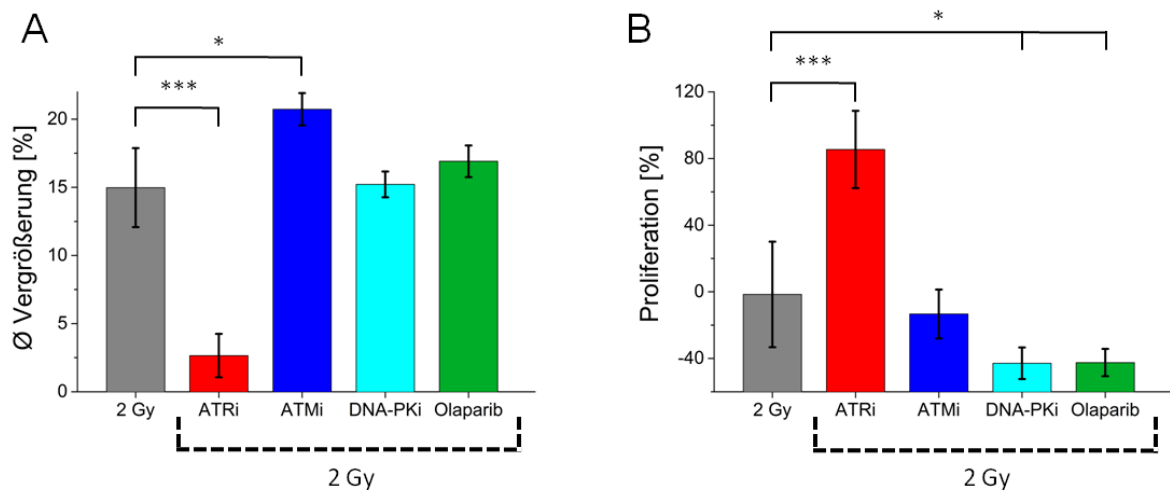


Abbildung 21: Einfluss der Inhibition von DNA Reparaturproteinen auf die Proliferation und die strahleninduzierte Vergrößerung

$4 \times 10^5$  Jurkat Zellen wurden 30 min vor der Bestrahlung mit 2 Gy mit den Inhibitoren für ATR, ATM, DNA-PK oder PARP behandelt. 48 h nach Bestrahlung wurden die Zellen mit dem automatischen Zellzähler EVE gezählt. A) Vergrößerung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. B) Proliferationsrate. (Mw.  $\pm$  Stabw. von  $\geq 3$  unabhängigen Experimenten; Signifikanztest durch Student'schen t-test \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ )

Die Daten zeigen eine deutliche dosisabhängige Durchmessergrößerung von Jurkat Zellen 48 h nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlung. Diese Durchmessergrößerung ist aufgrund der hohen Viabilität der Jurkat Zellen nicht im Zusammenhang mit einem nekrotischen Anschwellen zu sehen. Einher mit der Vergrößerung geht ebenfalls eine Hochregulierung des Zytokins IL-2 ohne eine Veränderung des Proteinlevels des Anergiefaktors RNF-128. Daher ist eine Teilaktivierung nach Bestrahlung zu vermuten. Die Vergrößerung lässt sich auf zwei Ursachen aufteilen. Ungefähr die Hälfte der Vergrößerung wird durch einen G2-Zellzyklusarrest verursacht, wohingegen die andere Hälfte der Vergrößerung auf eine  $H_2O_2$  vermittelte Vergrößerung hindeutet. Beide Anteile an der Vergrößerung konnten auf das DNA Reparaturprotein ATR zurückgeführt werden. Ionisierende Strahlung schädigt selbst direkt und indirekt über ROS die DNA. ATR erkennt die Schäden und initiiert zum einen effektiv einen Zellzyklusarrest für den DSBs ausschlaggebend sind, zum anderen ist die Vergrößerung abhängig von den durch die ROS erzeugten SSBs. ATR steht vermutlich am Anfang von einer

---

weitreichenden Signalkaskade. Da zur Vergrößerung mehr Biomasse generiert werden muss, müssen zwangsläufig Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Im Zusammenhang mit der Hochregulation von IL-2 nach Bestrahlung ist durchaus denkbar, dass Calcium eine Rolle für die Transkriptionsfaktoren spielen kann, obwohl die Daten keine eindeutige Aussage über die Beteiligung von Calcium an der Vergrößerung zulassen. Innerhalb von 15 min nach Bestrahlung ist keine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  zu detektieren, aber eine strahleninduzierte Vergrößerung kann durch das Abpuffern der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  mit dem Calciumchelator BAPTA-AM erreicht werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Calcium eine wichtige Funktion bei der Aktivierung und der Expression von IL-2 spielt. Die Calcium-abhängige Phosphatase Calcineurin könnte den Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) dephosphorylieren, wodurch NFAT in den Nukleus wandert und dort die Translation von IL-2 starten könnte (Gwack et al. 2007). Wie eine zeitlich verzögerte Calciumantwort durch ATR initiiert werden kann, welche Proteine Downstream von ATR aktiviert werden und eine Rolle spielen, bleibt aufzuklären.

---

## 4 Diskussion

---

In dieser Arbeit sollte der Einfluss ionisierender Strahlung auf die humane Zelllinie Jurkat untersucht und die zugrundeliegenden Signalkaskaden eingegrenzt werden. Im Zentrum der Arbeit steht die Beobachtung, dass ionisierende Strahlung eine deutliche Änderung der Morphologie von Jurkat Zellen auslöst. Bestrahlte Jurkat Zellen vergrößern dosisabhängig ihren Durchmesser über 48 h. Eine Vergrößerung des Zelldurchmessers deutet eine Immunaktivierung an, die auch auf Proteinebene durch Western Blots und Immunfluoreszenzfärbungen gegen IL-2 ebenfalls 48 h nach Bestrahlung bestätigt werden konnte. IL-2 ist ein etablierter Marker für eine Immunaktivierung von T-Zellen (Malek 2008; Boyman and Sprent 2012). IL-2 konnte jedoch nicht im Medium von Jurkat Zellen nachgewiesen werden. Der Versuch durch Zentrifugation mit mehreren Filtern für bestimmte Proteingrößen und anschließendem Western Blot schlug genauso fehl wie der Nachweis mittels eines Elisa Kits von Thermofisher gegen IL-2. Dies schließt nicht die Möglichkeit aus, dass IL-2 sekretiert wird, sondern bedarf weiterer Untersuchungen mit geeigneteren Methoden.

Obwohl die Expression von IL-2 zellintern hochreguliert wird, konnte keine veränderte Expression von CD25 gezeigt werden. CD25 bildet die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2 Rezeptors und wird erst nach einer vollen Aktivierung durch Antigen und Costimulation exprimiert. Der Zustand der Jurkat Zellen wird im Folgenden zwar als Aktivierung bezeichnet, wenngleich CD25 nicht exprimiert wird und der Zustand somit nur aktivierungsähnlich ist.

Anstelle der Aktivierung könnten Jurkat Zellen auch in den Zustand der Anergie übergehen. Bestrahlte Jurkat Zellen zeigen infolge einer Bestrahlung aber keine Anzeichen in den Zustand der Anergie zu wechseln, da sie RNF-128, ein Protein das von anergischen Zellen exprimiert wird (Anandasabapathy et al. 2003; Schartner et al. 2009; Whiting et al. 2011), nicht stärker als Kontrollzellen exprimieren. Im Zustand der Anergie sind T-Zellen funktionell inaktiv und nur sehr schwer wieder aktivierbar. Es soll verhindert werden, dass Immunzellen auf körpereigene Zellen reagieren. Obwohl es mit der Produktion von IL-2 und keiner veränderten Expression von RNF-128 einige Indizien für eine Aktivierung gibt, scheint diese nicht vollständig zu sein. Zu einer vollen Aktivierung benötigt eine T-Zelle einen Stimulus wie ein Antigen und zusätzlich eine Costimulation durch weitere Bestandteile eines Pathogens. Ionisierende Strahlung könnte nur einen dieser Reize imitieren, was zur Produktion von IL-2 ausreicht, aber eben nicht zu vollen Initiierung der Immunantwort.

---

Als Maß für die Aktivierung wurde der mittlere Durchmesser von Jurkat Zellen betrachtet und durch Inhibitoren und Agenzien versucht, die strahleninduzierte Vergrößerung zu verhindern oder nachzuahmen. Drei potentielle Signalkaskaden wurden als Ursache für die Aktivierung vermutet. Neben einer strahleninduzierten Signalkaskade über ROS und Calcium konnte auch ein G2-Zellzyklusarrest oder eine Signalkaskade über DSB-Reparaturproteine für die Vergrößerung verantwortlich sein. Die gezeigten Daten legen nahe, dass jeweils die Hälfte der Vergrößerung der Zellen durch den G2-Arrest und der Rest auf eine ROS-induzierte Signalkaskade, die noch einen anderen noch nicht bekannten Prozess induziert, zurückzuführen sind. Für beide Signalwege konnte ATR als entscheidendes Protein ausgemacht werden. Eine strahleninduzierte Aktivierung dieses Proteins kann sowohl den Zellzyklusarrest als auch den weiteren Anteil der Vergrößerung durch die ROS erklären. Die einzelnen Signalwege wurden separat voneinander experimentell untersucht. Aus diesem Grund wird im Folgenden einzeln auf sie eingegangen. Auf zellulärer Ebene ist es allerdings naheliegend, dass die Signalwege zusammenspielen, verknüpft oder womöglich abhängig voneinander sind.

---

#### **4.1 Signalkaskade über ROS und Calcium in Jurkat Zellen**

---

Die Untersuchung der strahleninduzierten Signalkaskade über ROS und Calcium sollte mikroskopisch erfolgen. Eine Herausforderung stellte die Suche nach einem geeigneten Beschichtungsmaterial zur Auftragung auf die Deckgläser dar. Jurkat Zellen befinden sich in Suspension und haften somit nicht an Oberflächen wie dem Zellkulturflaschenboden aus Polystyrol an. Eine Ausnahme bildet die Deckglasoberfläche auf der die Zellen zur mikroskopischen Untersuchung platziert werden. Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass die Zellen auf Glas haften und mit zunehmender Zeit immer stärker abflachen. Das hat zur Folge, dass sich Jurkat Zellen auf Glas nicht mehr in ihrem Ruhezustand befinden, da sie mechanischem Stress ausgesetzt sind, der eine Calciumantwort auslöst (Verstraeten et al. 2010; Xu et al. 2013). Aber besonders um empfindliche Signalmoleküle wie Calcium zu untersuchen, ist es unerlässlich, dass sich Jurkat Zellen im Ruhezustand befinden; jegliche unspezifische Stimulierung der Jurkat Zellen kann zu einer Calciumantwort führen, die stärker ist als die in dieser Arbeit gezielt eingesetzten Stimuli. Die Herausforderung bestand folglich darin, ein Protokoll zu finden, dass ein Abflachen verhindert, aber trotzdem ein moderates Anhaften der Zellen garantiert, sodass ein Austausch der externen Lösung in mikroskopischen Untersuchungen möglich war. Als Kontrolle neben der Morphologie der

---

Zellen diente die Beobachtung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . Eine Veröffentlichung in der die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in Jurkat Zellen untersucht wurde, diente als Ausgangspunkt auf der Suche nach dem adäquaten Deckschichtmaterial (Wolf et al. 2015).

Die besten Ergebnisse lieferte die Vorbehandlung der Glasoberfläche in einem Plasmaofen, gefolgt vom Aufbringen einer ersten Schicht aus 5 % BSA mit einem Spincoater. Die BSA Schicht sollte den Kontakt der Zellen mit dem Glas unterbinden. Eine zweite Schicht aus PLL ermöglichte ein moderates Anhaften der Zellen. Dessen ungeachtet mussten die Jurkat Zellen mindestens 30 min bevor sie mikroskopiert wurden auf diese Oberfläche pipettiert werden, da eine schwache Reaktion der Calciumantwort durch das Aufkommen der Zellen auf der Oberfläche nicht vermieden werden konnte.

Nachdem die adäquaten Protokolle für die Vorbehandlung der Glasoberfläche für mikroskopische Studien an Jurkat Zellen ausgearbeitet waren, konnte die Reaktion von bestimmten Signalmolekülen auf definierte Stimuli untersucht werden. Von großem Interesse war die zugrundeliegende Signalkaskade, die Jurkat Zellen in den aktivierungsähnlichen Zustand überführt. Als Grundlage für die Aktivierung wurde von einer Signalkaskade ausgegangen, die zuvor in A549 und HEK293 Zellen beschrieben wurde (Gibhardt et al. 2015). Eine Bestrahlung führt in diesen Zellen zu einer unmittelbaren Erhöhung der intrazellulären ROS Konzentration. Wurde der Strahleneffekt mit extern appliziertem  $H_2O_2$  nachgeahmt, erhöhte sich die  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . ROS und insbesondere Calcium spielen bei der Immunaktivierung durch Antigene wichtige Rollen als *second messenger*. Daher wurde auch im Falle der Jurkat Zellen ein Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Signalkaskade und der strahlenbedingten Aktivierung von Jurkat Zellen vermutet.

ROS- und Calciumsensoren ermöglichten es, diese Signalmoleküle mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung mikroskopisch zu quantifizieren. Wie schon in A549 und HEK293 Zellen war ein Anstieg des ROS Levels unmittelbar nach Bestrahlung zu detektieren. Die Kinetik und die Amplitude dieses Anstiegs verliefen in Jurkat Zellen heterogen und damit anders als in A549 und HEK293 Zellen ab. Ein sehr geringer Anstieg des HyPer Ratios über die gesamte Versuchsdauer von 15 min war ebenso zu beobachten wie ein rascher und sehr starker Anstieg des Ratios innerhalb weniger Minuten mit anschließendem Abfall. Die Dosis von 1 Gy oder 10 Gy hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Kinetik oder die Amplitude. Über die Ursachen der starken Heterogenität der Reaktion können nur Vermutung angestellt werden.



---

Die heterogene Stressantwort der Jurkat Zellen kann nicht auf das Sensorsystem zurückgeführt werden, da hier mit HyPer der gleiche genetisch kodierte ratiometrische  $\text{H}_2\text{O}_2$  Sensor verwendet wurde wie bereits in der Arbeit von Gibhardt et al. 2015. Als Quellen zur Generierung von ROS nach Bestrahlung sind die Mitochondrien und das Enzym NADPH Oxidase bekannt (Leach et al. 2001; Collins-Underwood et al. 2008). Das Expressionslevel der NADPH Oxidase ist nicht vom Zellzyklus abhängig, genauso wie das Verhältnis der Mitochondrienmembran zur Fläche des Zytoplasma während des gesamte Zellzyklus nahezu unverändert bleibt (Posakony et al. 1977). Daher ist die Heterogenität des ROS Anstiegs nach Bestrahlung nicht auf zellzyklusspezifische Variationen in der Anzahl der ROS Produzenten zurückzuführen. Möglich wäre hingegen, dass verschiedene Isoformen der NADPH Oxidase nur zu bestimmten Zeitpunkten während des Zellzyklus exprimiert werden und diese Isoformen auch dann verstärkt ROS nach einer Bestrahlung produzieren. Ionisierende Strahlung regt die Produktion von ROS durch die NADPH Oxidase an (Collins-Underwood et al. 2008). Dieses Verhalten würde zu der erhöhten ROS Produktion durch die NADPH Oxidase aufgrund einer Stimulierung durch den TCR passen. Die Aktivität der NADPH Oxidase ist wichtig für die Aktivierung von T-Zellen, da T-Zellen ohne die NADPH Oxidase ein verändertes Verhalten nach Stimulierung des TCR zeigen (Jackson et al. 2004). Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass T-Zellen IL-2 und CD25 nach einer Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  exprimieren (Los et al. 1995) und dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein wichtiger *second messenger* bei der Aktivierung ist (Reth 2002).

Die Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  wurden durch extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgeahmt.  $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöht die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration, wenn es extern appliziert wird, da es membranpermeabel ist. Die Konzentration intrazellulär ist ungefähr 200- bis 500-fach niedriger als die extern applizierte Konzentration (Sies 2017). Eine Kalibrierung des HyPer Ratioanstiegs in HEK293 Zellen gegen verschiedene externe  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen ermöglichte die Abschätzung der Konzentration, die extern appliziert werden muss, um den gleichen Ratioanstieg des  $\text{H}_2\text{O}_2$  Sensors wie nach Bestrahlung zu erzeugen (Gibhardt et al. 2015). Aufgrund der großen Spanne des Ratioanstiegs in Jurkat Zellen lag diese zu 1 und 10 Gy korrespondierende externe Konzentration zwischen 1 und 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . In den Experimenten zur Charakterisierung der Calciumantwort auf externes  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden die Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Jurkat Zellen reagierten sensibler auf extern appliziertes  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit einer Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  als A549 Zellen. Der Anteil der reagierenden Zellen war bei vergleichbaren Konzentrationen höher. Bei 1  $\mu\text{M}$  externem  $\text{H}_2\text{O}_2$

---

reagierten bereits 47 % der Jurkat Zellen, bei 3  $\mu\text{M}$  externem  $\text{H}_2\text{O}_2$  hingegen nur 13 % der A549 Zellen. Die Ergebnisse unterstreichen, dass die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration, die in Jurkat Zellen nach Bestrahlung gemessen wurde, zu einer Calciumantwort führt. Das trifft sowohl für die untere Grenze der  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentration wie auch für die höchste Konzentration zu. Ferner zeigen die Daten, dass die Dauer der Erhöhung in Jurkat Zellen ebenfalls länger als in A549 Zellen ist (Jurkat Zellen  $\sim 5\text{-}30$  s bei 1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ; A549 Zellen  $\sim 2\text{-}9$  s bei 3  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A549 Zellen reagierten bei geringen Konzentrationen von 3 und 30  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nur mit kurzzeitigen Oszillationen. Externes  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der höchsten in dieser Arbeit eingesetzten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) erhöht die  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in einer ähnlichen Art und Weise wie der Antikörpermix, der zur Aktivierung von T-Zellen genutzt wird. In Jurkat Zellen ruft dieser Antikörpermix allerdings keine Vergrößerung hervor. Ein dauerhaft erhöhte  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  nach externem  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Behandlung mit dem Antikörpermix lässt auf vergleichbar ablaufende Signalwege schließen. Der Antikörpermix stimuliert eine Calciumausschüttung über das Binden an den TCR und die Initiierung folgender Signalkaskaden (Feske 2007). Die Bindung eines Antigens bedingt eine erhöhte Produktion an ROS, vermutlich über einen NADPH Oxidase abhängigen Weg. Zudem wird vermutet, dass diese Produktion entscheidend für den Aktivierungsprozess ist (Simeoni and Bogeski 2015). Es bleibt zwar unklar wie genau externes  $\text{H}_2\text{O}_2$  in diesen Prozess eingreifen könnte, allerdings scheint externes  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Aktivierungskaskade durch Binden eines Antigens an den TCR an einer bisher unbekannten Stelle kurzzuschließen, weshalb es auch zu einer ähnlichen Calciumantwort der unterschiedlichen Stimuli kommt.

Eine direkte Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  durch ionisierende Strahlung konnte weder in A549 Zellen noch in Jurkat Zellen festgestellt werden. Unmittelbar nach Bestrahlung war keine Veränderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  detektierbar. Auf diese Strahleninsensitivität der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung wurde bereits in weiteren Zelllinien hingewiesen, die selbst auf die gezielte Teilchenbestrahlung mit hohem LET nicht reagierten (Hallahan et al. 1994; Du et al. 2008). Es gibt prinzipiell drei Möglichkeiten als Erklärung:

- 1) Der Calciumsensor funktioniert nicht
- 2) Calcium wird nur lokal oder in den Organellen ausgeschüttet
- 3) Calcium steigt nicht direkt nach Bestrahlung an, sondern Minuten oder sogar Stunden nach Bestrahlung

---

Eine Fehlfunktion des Sensors (1) kann ausgeschlossen werden, da der Sensor in der Lage war ein Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  durch Ionomycin zuverlässig am Ende jedes Experiments zu detektieren. Eine lokale Ausschüttung des Calciums (2) konnte bereits in A549 Zellen mit dem gleichen Sensor und geringen  $H_2O_2$  Konzentrationen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit sollten lokale Erhöhungen des Calciums im Zytosol auch in Jurkat Zellen detektierbar gewesen sein. Allerdings könnte Calcium in den Organellen wie den Mitochondrien oder auch im Nukleus nach Bestrahlung erhöht werden und dort direkt weitere Signalkaskaden initiieren. Um Aufschluss über ein Calciumsignalling in gezielten Kompartimenten der Zelle zu erhalten, müssten genetisch kodierte Sensoren verwendet werden, die durch eine Erkennungssequenz direkt in die Kompartimente transportiert werden und dort Veränderungen der Calciumkonzentration detektieren.

Unter der Annahme, dass die Detektion des Calciums funktioniert und es sich nicht um lokale Erhöhungen in den Kompartimenten handelt, könnte die unmittelbare Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , die extern appliziertes  $H_2O_2$  nach dessen Zugabe auslöst, entkoppelt von der Vergrößerung der Jurkat Zellen durch eine 10 minütige Behandlung mit  $H_2O_2$  sein. Nichtsdestotrotz wird ein Zusammenhang zwischen der strahleninduzierten Vergrößerung und einer Veränderung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  gesehen, da Calcium ein essentieller Bestandteil in der Aktivierungssignalkaskade ist und vor allem für die Expression von IL-2 über Calmodulin, Calcineurin und NFAT verantwortlich ist (Gwack et al. 2007).

Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  durch  $H_2O_2$ , die in den Experimenten induziert werden konnte, kann aus dem umgebenden Medium durch Kanäle in der Plasmamembran geschehen ohne einen Einstrom aus den internen Speichern (Grupe et al. 2010) oder durch Entlassen des Calciums aus dem ER über den  $IP_3R$  ohne den Einstrom über Kanäle in der Plasmamembran zu beeinflussen (Kiselyov and Muallem 2016). Die Zugabe von  $LaCl_3$  zum Kultivierungsmedium hatte keinen Einfluss auf die strahleninduzierte Vergrößerung. Wurde eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  durch BAPTA gepuffert, zeigte sich keine Vergrößerung durch Bestrahlung. Die Daten legen zum einen nahe, dass das Calcium eine Rolle in dem Prozess der Vergrößerung spielt und möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt nach Bestrahlung wichtig wird. Die Daten weisen weiter darauf hin, dass Calcium nicht aus dem extrazellulären Raum kommt, sondern aus internen Speichern stammt und dass der damit verbundene Anstieg der  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  wichtig für die Vergrößerung und Aktivierung der Jurkat Zellen ist. Calcium würde folglich nicht in der frühen Signalkaskade (innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung) eine Rolle spielen (3), sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt (nach mehrere

---

Minuten oder Stunden). Diese verspätete Reaktion nach Bestrahlung könnte durch eine anhaltende ROS Produktion eine Calciumreaktion auslösen. Dass die NADPH Oxidase und die Mitochondrien vermehrt ROS infolge einer Bestrahlung produzieren, wurde bereits berichtet (Leach et al. 2001; Collins-Underwood et al. 2008). Direkt nach Bestrahlung konnte mit Hilfe des HyPer Sensors für Jurkat Zellen gezeigt werden, dass nicht in allen Zellen größere Mengen an  $H_2O_2$  entstehen. Die vermutete anhaltende ROS Produktion könnte intern einen Schwellenwert an ROS generieren, der ausreicht um Calcium aus den internen Speichern zu entlassen. Diese postulierte andauernde ROS Produktion nach Bestrahlung, könnte auch erklären, warum ROS *scavenger* wie Vitamin C und Trolox oder NAC die Vergrößerung nicht beeinflussen. Wenn die NADPH Oxidase und die Mitochondrien über einen längeren Zeitraum vermehrt ROS produzieren, könnten sämtliche Radikalfänger über die Zeit oxidiert werden. Es würde ein verzögerter Effekt entstehen, da die ROS *scavenger* erst ihre Wirkung verlieren müssten, bevor sich die Konzentration an  $H_2O_2$  bis zu dem Schwellenwert erhöht.  $H_2O_2$  würde direkt durch die nach der Bestrahlung entstehenden ROS und indirekt durch die anhaltende ROS-Produktion der NADPH Oxidase und der Mitochondrien zur Ausschüttung von Calcium aus dem ER führen. Eine weitere Hypothese wäre, dass nach Bestrahlung durch die NADPH Oxidase extrazellulär produzierte ROS einen ähnlichen Effekt haben, wie extern appliziertes  $H_2O_2$ . Da die Konzentration durch eine externe Zugabe von  $H_2O_2$  allerdings sprunghaft ansteigt, würde dieser Effekt unverzüglich nach Zugabe ablaufen; dies wird am Beispiel der bereits thematisierten Calciumausschüttung nach externer  $H_2O_2$  Zugabe deutlich. Die Produktion der ROS durch die NADPH Oxidase verläuft kontinuierlich und nicht sprunghaft, was wiederum eine verzögerte Ausschüttung des Calciums aus den internen Speichern stützen würde und ebenfalls erklären würde, warum die ROS *scavenger* keinen Effekt auf die Vergrößerung hatten. Dazu würden die extern produzierten ROS einen Angriffspunkt benötigen, zum Beispiel einen Rezeptor, der nach Oxidation aktiviert wird und weitere Signalkaskaden bis hin zur Calciumausschüttung veranlasst. Für T-Zellen sind diese Prozesse bisher noch nicht bekannt (Simeoni and Bogeski 2015). Dennoch wurde schon von anderen Rezeptoren berichtet, die durch Oxidation nachgeschaltete Signalkaskade aktivieren können (Paulsen et al. 2011). Ob eine anhaltende Produktion der ROS intrazellulär und/oder extrazellulär einen Einfluss auf die Ausschüttung von Calcium und die Aktivierung haben, kann nicht hinreichend geklärt werden. Eine Beteiligung der NADPH Oxidase oder der Mitochondrien ist naheliegend und sollte weiter untersucht werden.

---

Nachdem die Beteiligung von ROS und Calcium als Signalmoleküle thematisiert wurden, werden nun weitere Ansatzpunkte für eine strahleninduzierte Aktivierung und Vergrößerung diskutiert. Ein ATR vermittelter Signalweg wäre potentiell auch in der Lage sich auf das ROS- und Calciumlevel der Zelle auszuwirken. ATR wird durch DNA Schäden, vor allem SSBs aber auch resektierte DSBs, rekrutiert. Eine Wirkung von ATR auf das Zytoplasma ist zwar nur selten in der Literatur beschrieben. Es werden jedoch vermehrt zelluläre Prozesse entdeckt, die durch ATR reguliert werden (Kidiyoor et al. 2016). Eine direkte Verbindung zwischen ATR und der Ausschüttung von Calcium aus dem ER oder einer erhöhten ROS Produktion bestehen bisher allerdings noch nicht.

Neben den *second messengern* stellen Kinasen eine Klasse von Proteinen dar, die an der Signalweiterleitung beteiligt sein können. In Immunzellen werden Kinasen der SRC-Familie aktiv, nachdem der TCR stimuliert wurde. Nicht nur zu diesem frühen Zeitpunkt nach Stimulierung sind Kinasen aktiv, sondern auch zu späteren Zeitpunkten der Aktivierungssignalkaskade. Viele Kinasen sind Calmodulin abhängig. Calmodulin aktiviert Calcium-abhängig eine Vielzahl von Proteinen (Berchtold and Villalobo 2014). Da unklar war an welchem Punkt der Signalkaskade Kinasen beteiligt sind, wurde der Inhibitor PP2 in zwei Konzentrationen eingesetzt. In geringen Konzentrationen (500 nM) inhibiert er spezifisch Kinasen der SRC-Familie, die kurz nach Stimulierung des TCR das Signal weiterleiten. Die strahleninduzierte Vergrößerung von Jurkat Zellen wurde durch diese Konzentration nicht beeinflusst. In höheren Konzentrationen (50  $\mu$ M) inhibiert PP2 unspezifisch viele weitere Kinasen (Brandvold et al. 2012). Eine strahleninduzierte Vergrößerung wird durch den Einsatz dieser Konzentration vollends unterdrückt. Dies unterstreicht die Bedeutsamkeit von Kinasen in der Signalkaskade zur Vergrößerung und Aktivierung. Es bleibt allerdings unklar welche Kinasen genau involviert sind, wobei ausgeschlossen werden kann, dass Kinasen der SRC-Familie für die Vergrößerung wichtig sind. Des Weiteren bleibt auch unklar, ob die Kinasen nur zur Signalweiterleitung wie nach Stimulation des TCR dienen oder an der Initiierung von Signalkaskaden beteiligt sind. Da ATR als die entscheidende Kinase ausgemacht werden konnte, ist es möglich, dass nur die Funktion von ATR beeinflusst wird und keine weiteren Kinasen beteiligt sind. Um den Einfluss weiterer Kinasen, außer ATR, auf die strahleninduzierte Vergrößerung zu untersuchen, müssen spezifische Inhibitoren verwendet werden, die Kinasen inhibieren, die für eine Antigen und TCR vermittelte Aktivierung wichtig sind. Eine Kinase in diesem Zusammenhang wäre die Proteinkinase C

---

(PKC), die überdies eine Verbindung zur  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  herstellen könnte und durch ROS aktivierbar ist (Cosentino-Gomes et al. 2012).

Die hier beschriebene zytosolische Signalkaskade ist nicht nur für 50 % der Vergrößerung verantwortlich, sondern initiiert die Aktivierung der Jurkat Zellen. Obwohl der G2-Zellzyklusarrest den verbleibenden Anteil zur Vergrößerung beisteuert, kann eine Aktivierung und Expression laut Literatur nur über zytosolische Signalkaskaden vermittelt werden, (s. Abb.6).

---

## 4.2 Vergrößerung durch den G2-Zellzyklusarrest

---

Im Laufe des Zellzyklus gewinnt die Zelle an Masse und vergrößert sich, sodass sie am Ende der G2-Phase ausreichend Zellvolumen hat um sich in der Mitose zu zwei Tochterzellen zu teilen. Aus diesem Grund sind Zellen in der G2-Phase größer als in der G1-Phase. Eine Anreicherung der Zellen in der G2-Phase könnte folglich eine Vergrößerung des Zelldurchmessers bewirken.

Jurkat Zellen sind, aufgrund ihrer p53 Defizienz, nicht in der Lage einen G1-Arrest effektiv einzuleiten (Syljuåsen and McBride 1999). Die hier präsentierten Daten verdeutlichen, dass Jurkat Zellen überwiegend im G2-Zellzyklusarrest arretieren, wenn sie mit ionisierender Strahlung bestrahlt wurden. Bei Kontrollzellen befinden sich ca. 15-20 % der Zellen im G2-Zyklus. In unbehandelten Jurkat Kontrollzellen sind Zelldurchmesser von 9 bis 12  $\mu\text{m}$  vertreten. Wobei davon ausgegangen werden kann, dass die größten Zelldurchmesser von 11 und 12  $\mu\text{m}$  zu Zellen in der G2-Phase gehören. Werden Zellen über 48 h künstlich im G2-Zyklus durch den CDK1 Inhibitor RO3306 arretiert (71 % in G2-Phase), sind vermehrt Zellen mit einem Durchmesser von 11 und 12  $\mu\text{m}$  zu verzeichnen. Dies bewirkt eine Durchmesserergrößerung von  $\sim 10\%$ . Allein durch den G2-Arrest war keine Vergrößerung wie nach einer Bestrahlung zu erwarten; bestrahlte Zellen sind deutlich größer als 11 und 12  $\mu\text{m}$ . Zelldurchmesser größer als 12  $\mu\text{m}$  kommen nur in bestrahlten Zellen vor. Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die strahleninduzierte Vergrößerung aus zwei Komponenten besteht, die unabhängig voneinander aktiviert werden können. Zum einen vergrößert eine ROS induzierte Signalkaskade über ATR die Zellen, sodass diese größer als 12  $\mu\text{m}$  werden. Zum anderen akkumuliert der durch ATR initiierte G2-Zellzyklusarrest Zellen

---

mit einem Durchmesser von 11 bis 12  $\mu\text{m}$ . Beide Signalkaskaden sind in gleichen Anteilen an der strahleninduzierten Vergrößerung von 20 % beteiligt.

Die zwei Komponenten aus denen sich die Vergrößerung der Jurkat Zellen zusammensetzt wären dementsprechend aufgeklärt. Der Auslöser und Angriffspunkt für ROS und auch ionisierende Strahlung wurden mit DSB Reparaturproteinen in Verbindung gebracht, da sie unverzüglich nach einer Bestrahlung oder einer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Behandlung rekrutiert werden und obendrein einen Zellzyklusarrest initiieren können. Erstaunlicherweise stellte sich ATR als das zentrale Protein für beide Signalkaskaden heraus.

---

### 4.3 Vergrößerung durch DNA-Reparaturproteine

---

Die Rekrutierung von Reparaturproteinen zu DNA Schäden zählen zu den ersten Reaktionen einer Zelle auf die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung. Daher wurde gefolgert, dass die Signalkaskaden, die eine strahleninduzierte Vergrößerung hervorrufen und alle damit verbunden Signalmoleküle ausschütten, auf DNA-Reparaturproteine zurückgeführt werden können.

Als schwerwiegendster DNA Schaden gilt der DSB. Behandlungen der Jurkat Zellen mit Proteinen, die DSBs künstlich erzeugen, zeigte eine Vergrößerung der Zellen, die sehr ähnlich der strahleninduzierten Vergrößerung ist. Mit NCS konnte eine konzentrationsabhängige Vergrößerung induziert werden, die dem dosisabhängigen Verlauf nach Röntgenbestrahlung gleicht. Dies drückt sich darüber hinaus auch im Größenhistogramm durch ähnliche Verteilungen der Zellpopulationen für die maximale Dosen/Konzentrationen aus.

Eine Behandlung mit dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid vergrößerte die Zellen deutlicher als angenommen. Etoposid erzeugt DSBs in dem es die Topoisomerase II daran hindert, einen DSB, der zum Entwinden der DNA erzeugt wird, wieder zu ligieren. Die Topoisomerase II ist in der S- und G2-Phase aktiv, sodass nur in diesen Zellzyklusphasen DSBs erzeugt werden. Daher wurde angenommen, dass sich nur S- und G2-Phase Zellen vergrößern. G1-Phase Zellen hingegen, die nicht geschädigt werden, sollten keine Größenzunahme zeigen. Dies sollte sich durch zwei Populationen im Größenhistogramm zeigen, während ein Teil (G1-Phase Zellen) die Durchmesser von Kontrollzellen behalten

---

sollten, sollten S- und G2-Phase Zellen die Größe von bestrahlten Zellen aufweisen. Aus diesem Grund sollte die mittlere Zelldurchmesserergrößerung geringer als nach einer Bestrahlung sein. Erstaunlicherweise vergrößern sich Etoposid behandelte Jurkat Zellen aber unabhängig vom Zellzyklus. Im Größenhistogramm ist eine Verlagerung zu größeren Zelldurchmessern von allen Zellen zu erkennen. Zusammen mit der Beobachtung, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zellen vergrößert, obwohl es in den eingesetzten Konzentrationen nur sehr wenige DSBs erzeugen sollte (Löbrich et al. 2010), führte zur Hypothese, dass nicht die DSBs für die zellzyklusunabhängige Vergrößerung verantwortlich sind, sondern SSBs. Untermuert wurde die Hypothese von der Beobachtung, dass die induzierten DSBs und die daraus resultierenden Focizahlen nach der Behandlung mit Etoposid,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder einer Bestrahlung mit 1 Gy nicht korrelieren. Eine Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  vergrößert Jurkat Zellen genauso stark wie eine Bestrahlung mit 1 Gy, obwohl es deutlich weniger DSBs erzeugt. Etoposid erzeugt in der eingesetzten Konzentration ungefähr so viele DSBs wie eine Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert. Etoposid vergrößert die Jurkat Zellen im Gegensatz dazu aber doppelt so stark.

Vor allem von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist bekannt, dass es sehr viele SSBs, aber nur wenige DSBs induziert, was mit den Experimenten zu den Focizahlen in Jurkat Zellen bestätigt werden konnte. NCS und Etoposid verursachen zwar vor allem DSBs, aber auch eine Vielzahl von SSBs (Kuo et al. 1984; Muslimović et al. 2009). ATR ist maßgeblich als DNA-Reparaturprotein für die Reparatur von SSBs beteiligt (Jackson and Bartek 2009). Inhibitoren für DNA Reparaturproteine sollten Aufschluss geben in wie weit eine eingeschränkte Funktion die Vergrößerung beeinflusst. Inhibitoren für die DNA-Reparaturproteine ATM, DNA-PK und PARP hatten keinen Einfluss auf die strahleninduzierte Vergrößerung. Der ATM Inhibitor führten im Gegenteil noch zu einer stärkeren Vergrößerung nach Bestrahlung. Der Inhibitor für ATR hatte sehr interessante Auswirkungen nach Bestrahlung. Er verhinderte die Vergrößerung nicht nur komplett, sondern bewirkte eine stärkere Proliferation im Vergleich zu Zellen, die nur bestrahlt wurden. Die verwendete Dosis von 2 Gy arretierte Jurkat Zellen effektiv im Zellzyklus, dementsprechend nahm die Zellzahl über 48 h nach Bestrahlung nur unmerklich zu. Der ATR Inhibitor ermöglichte eine Proliferation der Jurkat Zellen trotz Bestrahlung, wodurch die Zellzahl sich über 48 h fast verdoppelte. Obwohl mit dem ATR Inhibitor nicht die Proliferationsrate von Kontrollzellen erreicht werden konnte, ist eine Proliferation im Zusammenhang mit dieser Dosis bemerkenswert. ATR konnte folglich als der entscheidende Initiator für die Vergrößerung durch den G2-Arrest als auch durch die ROS initiierte Kaskade ausgemacht werden. Der schematische Ablauf einer möglichen



strahleninduzierten Signalkaskade, die mit den experimentellen Daten in Einklang steht und in der ATR die zentrale Rolle einnimmt, ist in Abb.22 dargestellt.

Bekräftigt wird diese Hypothese, dass ATR der Auslöser der Vergrößerung und Aktivierung durch Bestrahlung ist durch die Inhibition von ATM. ATM und ATR reparieren DSBs in enger Zusammenarbeit (Maréchal and Zou 2013). Kann ATM seine Funktion nicht erfüllen, da es inhibiert wird, könnte ATR dessen Aufgabe übernehmen. Dieser Umstand würde erklären, warum sich Zellen, die mit dem ATM Inhibitor behandelt wurden, nach Bestrahlung stärker vergrößern als Zellen ohne Inhibitorbehandlung. ATR könnte die Unterfunktion von ATM ausgleichen. Dieser stärkere Einfluss von ATR drückt sich durch die leicht gesteigerte Vergrößerung von Zellen aus.

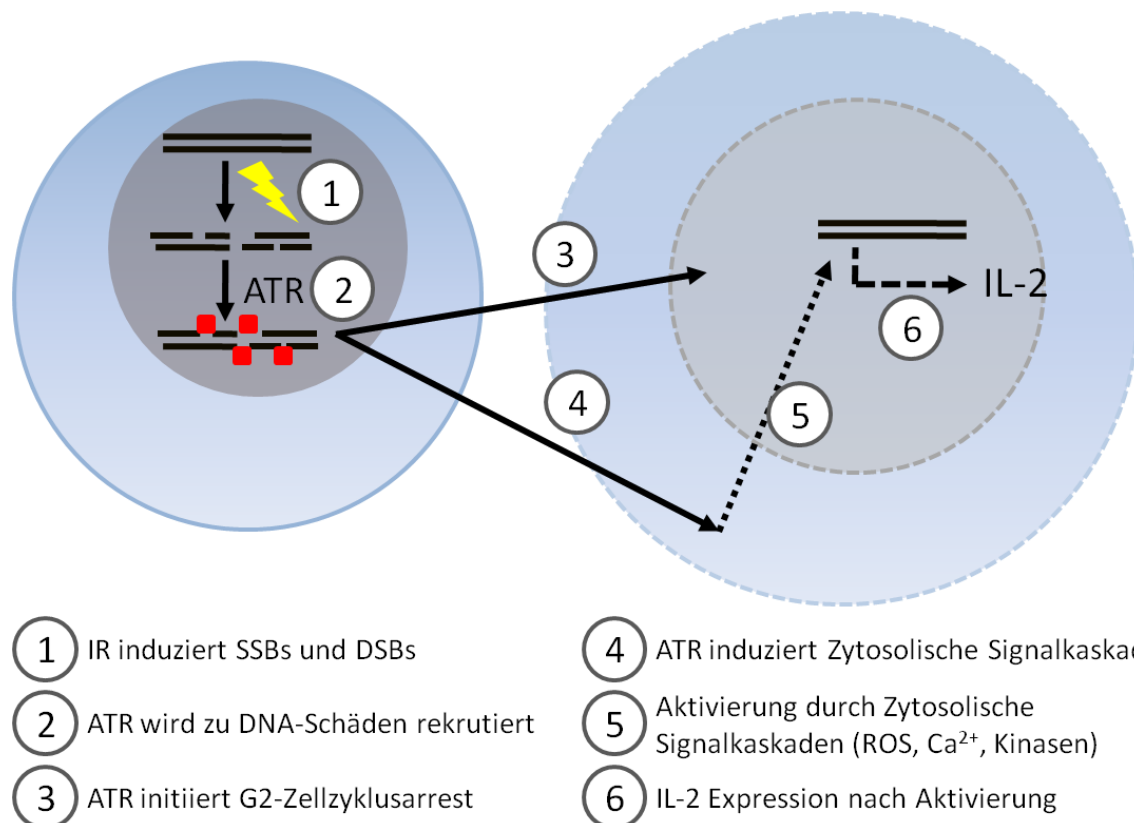


Abbildung 22: Schematischer Ablauf der Aktivierungs- und Vergrößerungssignalkaskaden

1) Ionisierender Strahlung (IR) induziert DNA-Schäden. Darunter unter anderem SSBs und DSBs. 2) ATR wird vor allem durch die SSBs, aber auch durch die DSBs rekrutiert. 3) ATR verursacht durch die DSBs einen G2-Zellzyklusarrest, der zu 50 % zur strahleninduzierten Vergrößerung beiträgt. 4) ATR scheint sich auf zytosolische Signalkaskaden auszuwirken 5) Neben dem Zellzyklusarrest wird eine zytosolische Signalkaskade aktiviert, deren Ablauf nicht vollends geklärt ist, aber an der ROS, Calcium und Kinasen und deren Wechselwirkung eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. 6) Am Ende der strahleninduzierten und durch ATR gestarteten Signalkaskade wird mit IL-2 ein aktivierungstypisches Zytokin exprimiert, das neben der Vergrößerung für eine Aktivierung spricht.

---

#### **4.3.1 ATR - mehr als nur DNA-Reparatur?**

---

ATR ist für seine Funktion in der Reparatur von DNA-Schäden bereits lange bekannt. In dieser Arbeit wird neben der Arretierung der Zellen im G2-Zellzyklus eine neue, bisher unbekannte Funktion von ATR entdeckt. ATR bewirkt eine Zunahme des Zelldurchmessers und umso bemerkenswerter, dass es eine Aktivierung von Jurkat Zellen initiiert. Die Funktion von ATR ist weitreichender als bisher angenommen und wurde lange Zeit unterschätzt. Es wurde unlängst vermutet, dass ATR sich auf die Plastizität des Kerns und des Zytoplasma auswirken kann (Kidiyoor et al. 2016). Von Kidiyoor wird eine Funktion von ATR innerhalb des Zytosols vermutet. Diese Vermutung ergibt sich auch aus den in dieser Arbeit produzierten Daten, da für die Zellzyklusarrest-unabhängige Größenzunahme Signalkaskaden innerhalb des Zytosol aktiviert werden müssen. Ob dies direkt durch ATR oder indirekt über weitere Proteine passiert, kann zu diesem Zeitpunkt nicht aussagekräftig belegt werden. Es ist hingegen bekannt, dass ATR nach Bestrahlung Einfluss auf die Funktion einer Vielzahl von Proteinen hat (Matsuoka et al. 2007). Die Funktion von ATR kann das Zellschicksal umfassend beeinflussen wie das Beispiel der strahleninduzierten Aktivierung von Jurkat Zellen verdeutlicht. Grundlegende und spezifische Funktionen von ATR außerhalb der DNA-Reparatur bedürfen zu diesem Zeitpunkt aber weiterer Aufklärung.

---

#### **4.4 Bedeutung der strahleninduzierten Aktivierung für die Strahlentherapie**

---

Aus der Aktivierung von Jurkat Zellen ergeben sich mögliche Konsequenzen für die Anwendung ionisierender Strahlung in der Tumorthherapie. Die Leukämiezelllinie Jurkat weist als entarte Zelllinie einige Unterschiede zu gesunden Zellen auf, z.B. die unkontrollierte Proliferation. Trotzdem oder gerade aus diesem Grund ergeben sich durch die entdeckte Signalkaskade einige zu beachtende Folgen der Bestrahlung.

Jurkat Zellen werden durch ionisierende Strahlung nicht nur aktiviert, sondern Patrick Voos konnte in seiner Dissertation zeigen, dass bestrahlte Jurkat Zellen vermehrt Integrine produzieren und auf einer Glasoberfläche schneller zum Abflachen und Anhaften neigen als unbestrahlte Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass Jurkat Zellen, die mit subletalen Dosen bestrahlt wurden, stärker metastasieren können und aggressiver in umliegendes Gewebe einwandern. Die Integrine nutzen sie um sich an Gewebe anzuhängen und die Zellverformung

---

benötigen sie um in Gewebe einzuwandern. Die Aggressivität dieser ohnehin sehr aggressiven Tumorart würde nochmals durch die Bestrahlung gesteigert und vermehrt zu Metastasen führen. Der Abscopale Effekt beschreibt genau den gegenteiligen Effekt. Die Bestrahlung bewirkt eine Reduktion der Tumormasse von nicht bestrahlten Tumorteilen wie zum Beispiel Metastasen (Siva et al. 2015). Bisher ist der Wirkmechanismus des Abscopalen Effekts nicht geklärt. Die Auswirkung der in dieser Arbeit beschriebenen strahleninduzierten Aktivierungskaskade in Jurkat Zellen, könnte eine mögliche Erklärung für diesen Effekt sein, falls diese Signalkaskade ähnliche Auswirkungen auf naive T-Zellen hätte.

---

#### **4.5 Mögliche Effekte ionisierender Strahlung auf Naive T-Zellen**

---

In dieser Arbeit wurde mit der Jurkat Zellen eine Leukämie T-Zelllinie untersucht, die sich durch ein verändertes Expressionslevel und eine permanente Proliferation von naiven T-Zellen unterscheidet. Aus diesem Grund kann über die Auswirkung der in Jurkat Zellen charakterisierten Signalkaskade samt Aktivierung in naiven T-Zellen nur spekuliert werden. Krebszellen wie die Jurkat Zelllinie gelten als strahlenresistenter als gesunde Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass naive T-Zellen noch sensitiver auf ionisierende Strahlung reagieren und möglicherweise geringere Dosen ausreichen um naive T-Zellen zu aktivieren. Dosen über 0,5 Gy würden den naiven T-Zellen nicht erlauben im Zellzyklus zu proliferieren, da ab diesen Dosen schon Zellzyklusarreste initiiert werden. Die Proliferation nach Aktivierung ist von entscheidender Bedeutung für die Verstärkung der Immunreaktion.

Eine Aktivierung durch Bestrahlung würde die Grundlage für eine Erklärung der Strahlenhormesis liefern, bei der Immunzellen effektiver Tumorgewebe nach geringen Strahlendosen bekämpfen (Liu 2006). Während der Tumorthherapie wird dem Tumor die größtmögliche Dosis verabreicht und das umliegende Gewebe nach Möglichkeit ausgespart. Die stetige Weiterentwicklung der Bestrahlungsarten und die Fraktionierung der gesamten Therapiedosis lieferten einen wichtigen Beitrag zu Reduktion der eingesetzten Strahlendosis. Trotzdem erhält auch das gesunde Gewebe immer noch geringe Strahlendosen. Diese Dosen könnten ausreichen um durch die hier präsentierte Signalkaskade Immunzellen unspezifisch zum Teil zu aktivieren. Diese Aktivierung erfolgt unspezifisch, da ionisierende Strahlung kein Antigen dargestellt auf das die Immunzellen reagieren könnten. Nichtsdestotrotz gibt es zwei Möglichkeiten wie die Signalkaskade das Immunsystem (hier am Beispiel von T-Zellen) gegen Krebszellen aktivieren kann. Eine volle Aktivierung in T-Zellen wird durch das Binden eines

---

Antigens an den TCR und einen Costimulus bewirkt. Ionisierende Strahlung könnte einen Teil der zur Aktivierung benötigten Stimulierung beitragen, wobei unklar bleibt, ob dies den Antigenkontakt oder den Costimulus darstellt. Sollte in diesen Zellen ein weiterer Stimulus durch die Krebszelle erfolgen, würde die T-Zelle auf die Krebszelle reagieren und weitere Zellen rekrutieren. Die Immunsuppressive Wirkung des Tumors wäre somit durch die Bestrahlung überbrückt. Die andere Möglichkeit für zur Aktivierung des Immunsystems gegen Krebszellen wäre eine indirekte Funktion der T-Zellen. Die nach Bestrahlung durch die Ausschüttung von IL-2 weitere Immunzellen stimulieren. Dies würde zwar ebenfalls unspezifisch erfolgen, aber die Wahrscheinlichkeit für eine Erkennung des Tumorgewebes würde sich durch die Stimulierung des Immunsystems und den angeregten Zustand erhöhen. Ein ähnlicher, ebenfalls positiver Effekt der Bestrahlung wurde bereits in T-Zellen beschrieben. Ionisierende Strahlung erhöhte die Expression von Proteinen und im speziellen der MHC I Proteine, die Antigene sensieren (Reits et al. 2006). Diese Strahlenhormesis des Immunsystems durch die in dieser Arbeit entdeckte Signalkaskade wäre eine Erklärung für den Abscopalen Effekt und stellt einen positiven Nebeneffekt der Bestrahlung dar.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der lindernde Effekt von geringen Strahlendosen in Bergwerken für Rheuma und Arthritis geplagte Menschen beschrieben. Auch dieser Effekt könnte mit der in Jurkat Zellen charakterisierten Signalkaskade in Verbindung gebracht werden. Da es sich bei beiden Erkrankung um Fehlfunktionen des Immunsystems handelt, können geringe Strahlendosen zu einer Überfunktion der Immunzellen führen, die auf körpereigenes Gewebe reagieren. Diese Überfunktion wird vom Körper erkannt und diese Zellen beseitigt.

Die Auswirkungen dieser Signalkaskade sind aber keineswegs begrenzt auf Immunzellen, da ROS und Calcium universelle *second messenger* darstellen. Das bedeutet, dass auch Krebszellen sich durch die Bestrahlung verändern könnten. Normalerweise haben Tumorzellen immunsuppressive Mechanismen, die sie davor schützen von Immunzellen angegriffen zu werden. Diese Mechanismen könnten durch geringe sowie auch hohe Strahlendosen beeinträchtigt werden. Das Immunsystem erkennt das durch die Bestrahlung veränderte Tumorgewebe und startet eine Immunreaktion gegen den Tumor. Entweder durch Bestrahlung oder durch Immunzellen abgetötete Tumorzellen dienen dann weiteren Immunzellen als Grundlage um Metastasen besser zu erkennen, da Metastasen grundsätzlich dem Ausgangstumor sehr ähnlich sind.

---

## 4.6 Ausblick

---

Die Immunaktivierung von Jurkat Zellen durch Bestrahlung und die zugrundeliegende Signalkaskade bedarf weiterer Untersuchung um alle beteiligten *second messenger* und Proteine aufzuklären. In weiteren Versuchen sollte die Calciumkonzentration nach Bestrahlung über einen längeren Zeitraum nach Bestrahlung untersucht werden, da innerhalb der ersten 15 min nach Bestrahlung keine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  detektiert werden konnte, aber eine Erhöhung im Zuge der Aktivierung vermutet wird und naheliegend ist. Die Calciumkonzentration im Nukleus sollte mit speziellen genetischen Calciumsensoren untersucht werden, die direkt in diesen transportiert werden. Zudem würde eine Reporterzelllinie, die z.B. GFP infolge einer Aktivierung exprimiert, die Aufklärung der Signalkaskade nach der strahleninduzierten Aktivierung vereinfachen. Gezielte Inhibitoren für Kinasen, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren geben einen zusätzlichen Aufschluss.

Diese Arbeit könnte interessante Ansatzpunkte für eine Kombination aus Strahlen- und Immuntherapie liefern, da beide Therapiearten eine Aktivierung und Sensibilisierung von Immunzellen gegen Tumorgewebe zur Folge haben.

---

## Curriculum Vitae

---

04/2014 – heute:

### **Promotion[Biologie]**

- Fachbereich Biologie, AG Thiel, TU Darmstadt, Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg 1657)
- Thema: „Kurz- und Langzeiteffekte ionisierender Strahlung auf die T-Zelllinie Jurkat“

08/2011 – 08/2013

### **Master of Science Technische Biologie**

- Fachbereich Biologie, AG Thiel, TU Darmstadt
- Thema: „Calcium imaging mit den Calciumindikatoren Fluo-4 AM und YC3.60“

10/2008 – 05/2011

### **Bachelor of Science Biologie**

- Fachbereich Biologie, AG Löbrich, TU Darmstadt
- Thema: „Untersuchung von putativen Reparaturproteinen in G1- und G2-Zellen mittels RNA-Interferenz und Immunfluoreszenz“

10/2006 – 04/2008

### **Studium Luft- und Raumfahrttechnik**

- Fakultät für Maschinenwesen, TU München

## Schul Ausbildung

08/1997 – 03/2006

### **Allgemeine Hochschulreife**

- Gymnasium Kirn
- Leistungskurse Biologie, Erdkunde, Mathematik

---

## Wissenschaftliche Tätigkeit

- 04-08/2014      Vorlesung: Radiation Biophysics, TU Darmstadt
- 11-12/2014      Seminar: „Molecular radiation biology: from the basics to clinical applications“, Universitätsklinikum Frankfurt a. M.
- 09/2015          Publikation: Gibhardt CS, Roth B, Schroeder I, **Fuck S**, Becker P, Jakob B, Fournier C, Moroni A, Thiel G (2015) *X-ray irradiation activates  $K^+$  channels via  $H_2O_2$  signaling*, *Sci.Rep.* doi:10.1038/srep13861
- 27.02 – 02.03.2016    Posterpräsentation, Biophysical Society Annual Meeting 2016, Los Angeles, USA

---

## Literaturverzeichnis

---

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177–96. doi: 10.1101/gad.914401
- Abraham RT, Weiss A (2004) Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4:301–8. doi: 10.1038/nri1330
- Adam-Vizi V, Starkov AA (2010) Calcium and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation: How to Read the Facts. *J Alzheimer's Dis* 20:S413–S426. doi: 10.3233/JAD-2010-100465
- Ahmed R, Gray D (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54–60. doi: 10.1126/science.272.5258.54
- Alavi M, Taeb S, Okhovat MA, et al (2016) Look Different: Effect of Radiation Hormesis on the Survival Rate of Immunosuppressed Mice. *J Biomed Phys Eng* 6:139–146.
- Anandasabapathy N, Ford GS, Bloom D, et al (2003) GRAIL: an E3 ubiquitin ligase that inhibits cytokine gene transcription is expressed in anergic CD4+ T cells. *Immunity* 18:535–47. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00084-0
- Antonelli F, Campa A, Esposito G, et al (2015) Induction and Repair of DNA DSB as Revealed by H2AX Phosphorylation Foci in Human Fibroblasts Exposed to Low- and High-LET Radiation: Relationship with Early and Delayed Reproductive Cell Death. *Radiat Res* 183:417–31. doi: 10.1667/RR13855.1
- Astoul E, Edmunds C, Cantrell DA, Ward SG (2001) PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol* 22:490–6. doi: 10.1016/S1471-4906(01)01973-1
- Aussel C, Marhaba R, Pelassy C, Breitmayer JP (1996) Submicromolar La3+ concentrations block the calcium release-activated channel, and impair CD69 and CD25 expression in CD3- or thapsigargin-activated Jurkat cells. *Biochem J* 313 ( Pt 3:909–913.
- Baecher-Allan C, Hafler DA (2006) Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:203–16. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00417.x
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–52. doi: 10.1038/32588
- Barnum KJ, O'Connell MJ (2014) Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol Biol* 1170:29–40. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_2
- Bedard K, Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005
- Belousov V V, Fradkov AF, Lukyanov KA, et al (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3:281–6. doi: 10.1038/nmeth866
- Berchtold MW, Villalobo A (2014) The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843:398–435. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.021
- Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200:315–9. doi: 10.1042/BST20110766
- Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim*



- 
- Biophys Acta - Mol Cell Res 1793:933–940. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.005
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21. doi: 10.1038/35036035
- Boyman O, Sprent J (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12:180–90. doi: 10.1038/nri3156
- Brandvold KR, Steffey ME, Fox CC, Soellner MB (2012) Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem Biol* 7:1393–8. doi: 10.1021/cb300172e
- Branzei D, Foiani M (2008) Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:297–308. doi: 10.1038/nrm2351
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497–501. doi: 10.1126/science.282.5393.1497
- Calloway N, Holowka D, Baird B (2010) A Basic Sequence in STIM1 Promotes Ca<sup>2+</sup> Influx by Interacting with the C-Terminal Acidic Coiled Coil of Orai1. *Biochemistry* 49:1067–1071. doi: 10.1021/bi901936q
- Carafoli E (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1115–22. doi: 10.1073/pnas.032427999
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125:S3-23. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980
- Chaudière J, Ferrari-Iliou R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 37:949–62. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00090-3
- Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13:227–42. doi: 10.1038/nri3405
- Cheng J, Haas M (1990) Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol* 10:5502–9. doi: 10.1128/MCB.10.10.5502.Updated
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193:3–34. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00287-7
- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259–68.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047–58. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.028
- Coggle JE, Lambert BE, Moores SR (1986) Radiation effects in the lung. *Environ Health Perspect* Vol. 70:261–291. doi: 10.1289/ehp.8670261
- Collins-Underwood JR, Zhao W, Sharpe JG, Robbins ME (2008) NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 45:929–938. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.024
- Cooper MD, Raymond DA, Peterson RD, et al (1966) The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med* 123:75–102. doi: 10.1084/jem.123.1.75
- Cosentino-Gomes D, Rocco-Machado N, Meyer-Fernandes JR (2012) Cell signaling through protein kinase C oxidation and activation. *Int J Mol Sci* 13:10697–721. doi: 10.3390/ijms130910697
- d'Adda di Fagagna F (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 8:512–22. doi: 10.1038/nrc2440
- Dahm-Daphi J, Sass C, Alberti W (2000) Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int J Radiat Biol*
-

---

76:67–75. doi: 10.1080/095530000139023

- Dasika GK, Lin SC, Zhao S, et al (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18:7883–99. doi: 10.1038/sj.onc.1203283
- Deckbar D, Birraux J, Krempler A, et al (2007) Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J Cell Biol* 176:749–55. doi: 10.1083/jcb.200612047
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8:2540–51. doi: 10.1101/gad.8.21.2540
- Doss M (2013) Linear No-Threshold Model VS. Radiation Hormesis. *Dose Response* 11:480–97. doi: 10.2203/dose-response.13-005.Doss
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:11–22. doi: 10.1038/nrc1252
- Droge W, Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001
- Du G, Fischer BE, Voss K-O, et al (2008) The absence of an early calcium response to heavy-ion radiation in Mammalian cells. *Radiat Res* 170:316–26. doi: 10.1667/RR1270.1
- Durante M, Loeffler JS (2010) Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 7:37–43. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.183
- Fanger CM, Rauer H, Neben AL, et al (2001) Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem* 276:12249–56. doi: 10.1074/jbc.M011342200
- Fathman CG, Lineberry NB (2007) Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 7:599–609. doi: 10.1038/nri2131
- Feinendegen LE, Pollycove M, Sondhaus CA (2004) Responses to low doses of ionizing radiation in biological systems. *Nonlinearity Biol Toxicol Med* 2:143–71. doi: 10.1080/15401420490507431
- Felix R (2005) Molecular regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Recept Signal Transduct Res* 25:57–71. doi: 10.1081/RRS-200068102
- Feske S (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7:690–702. doi: 10.1038/nri2152
- Feske S, Skolnik EY, Prakriya M (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol* 12:532–547. doi: 10.1038/nri3233
- Forman HJ, Maiorino M, Ursini F (2010a) Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry* 49:835–42. doi: 10.1021/bi9020378
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A (2010b) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 30:1–12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006
- Fracchia KM, Pai CY, Walsh CM (2013) Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol* 4:324. doi: 10.3389/fimmu.2013.00324
- Gambade A, Zreika S, Guéguinou M, et al (2016) Activation of TRPV2 and BKCa channels by the LL-37 enantiomers stimulates calcium entry and migration of cancer cells. *Oncotarget* 7:23785–800. doi: 10.18632/oncotarget.8122

- 
- Gee KR, Brown K a, Chen WN, et al (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27:97–106. doi: 10.1054/ceca.1999.0095
- Gellert M (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71:101–32. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203
- Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, et al (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275:37137–49. doi: 10.1074/jbc.M003941200
- Gibhardt CS (2014) Radiation induced activation of potassium-channels : The role of ROS and calcium. TU Darmstadt
- Gibhardt CS, Roth B, Schroeder I, et al (2015) X-ray irradiation activates K<sup>+</sup> channels via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Sci Rep* 5:13861. doi: 10.1038/srep13861
- Gibson JN, Beesetty P, Sulentic C, Kozak JA (2016) Rapid Quantification of Mitogen-induced Blastogenesis in T Lymphocytes for Identifying Immunomodulatory Drugs. *J Vis Exp* 1–10. doi: 10.3791/55212
- Gillis S, Watson J (1980) Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152:1709–19. doi: 10.1084/jem.152.6.1709
- Girault A, Brochiero E (2014) Evidence of K<sup>+</sup> channel function in epithelial cell migration, proliferation, and repair. *Am J Physiol Cell Physiol* 306:C307-19. doi: 10.1152/ajpcell.00226.2013
- Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* 6:260–271. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.010
- Graña X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11:211–9. doi: 10.1300/J110v11n01\_11
- Grupe M, Myers G, Penner R, Fleig A (2010) Activation of store-operated I(CRAC) by hydrogen peroxide. *Cell Calcium* 48:1–9. doi: 10.1016/j.ceca.2010.05.005
- Gwack Y, Feske S, Srikanth S, et al (2007) Signalling to transcription: Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42:145–156. doi: 10.1016/j.ceca.2007.03.007
- Hahn AT, Jones JT, Meyer T (2009) Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle* 8:1044–1052. doi: 10.4161/cc.8.7.8042
- Hallahan DE, Bleakman D, Virudachalam S, et al (1994) The role of intracellular calcium in the cellular response to ionizing radiation. *Radiat Res* 138:392–400. doi: 10.2307/3578688
- Halliwell B (1974) SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE: SOLUTIONS TO THE PROBLEMS OF LIVING WITH OXYGEN. *New Phytol* 73:1075–1086. doi: 10.1111/j.1469-8137.1974.tb02137.x
- Harwood NE, Batista FD (2008) New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* 28:609–19. doi: 10.1016/j.immuni.2008.04.007
- Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB (2008) Role of TRPM2 Channel in Mediating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Ca<sup>2+</sup> Entry and Endothelial Hyperpermeability. *Circ Res* 102:347–355. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160176
-

- 
- Hidayat S, Yoshino K, Tokunaga C, et al (2003) Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a leucine derivative induces G1 arrest in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301:417–23. doi: 10.1016/S0006-291X(02)03052-8
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366–74. doi: 10.1038/35077232
- Hogan PG, Rao A (2015) Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun* 460:40–49. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.110
- Hoth M, Penner R (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359–386. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019681
- Huang J, Wang QJ, Yang S, et al (2011) Irradiation enhances human T-cell function by upregulating CD70 expression on antigen-presenting cells in vitro. *J Immunother* 34:327–35. doi: 10.1097/CJI.0b013e318216983d
- Iliakis G, Wang Y, Guan J, Wang H (2003) DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22:5834–5847. doi: 10.1038/sj.onc.1206682
- Imboden JB, Weiss A, Stobo JD (1985) The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J Immunol* 134:663–5.
- Ismail IH, Nyström S, Nygren J, Hammarsten O (2005) Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 280:4649–4655. doi: 10.1074/jbc.M411588200
- Iyama T, Wilson DM (2013) DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* 12:620–636. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Jackson S, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461:1071–1078. doi: 10.1038/nature08467
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, et al (2004) T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* 5:818–27. doi: 10.1038/ni1096
- Janeway CA, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197–216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
- Janiak MK, Wincenciak M, Cheda A, et al (2017) Cancer immunotherapy: how low-level ionizing radiation can play a key role. *Cancer Immunol Immunother* 0:1–14. doi: 10.1007/s00262-017-1993-z
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, et al (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 52:1–6. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030
- Kapsenberg ML (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984–93. doi: 10.1038/nri1246
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247–54. doi: 10.1038/85798
- Kidiyoor GR, Kumar A, Foiani M (2016) ATR-mediated regulation of nuclear and cellular plasticity. *DNA Repair (Amst)*. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.05.020
- Kim JY, Muallem S (2011) Unlocking SOAR releases STIM. *EMBO J* 30:1673–1675. doi: 10.1038/emboj.2011.107
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of

- 
- DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 36:5678–5694. doi: 10.1093/nar/gkn550
- Kiselyov K, Muallem S (2016) ROS and intracellular ion channels. *Cell Calcium* 60:108–14. doi: 10.1016/j.ceca.2016.03.004
- Kuo WL, Meyn RE, Haidle CW (1984) Neocarzinostatin-mediated DNA damage and repair in wild-type and repair-deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 44:1748–51.
- Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4:181–9. doi: 10.1038/nri1312
- Lang F, Shumilina E, Ritter M, et al (2006) Ion channels and cell volume in regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Contrib Nephrol* 152:142–60. doi: 10.1159/000096321
- Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92–7. doi: 10.1126/science.290.5489.92
- Lavin MF (2008) Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:759–69. doi: 10.1038/nrm2514
- Leach JK, Tuyle G Van, Lin P, et al (2001) Ionizing Radiation-induced , Mitochondria-dependent Generation of Reactive Oxygen / Nitrogen 1. 3894–3901.
- Lee C, Kim J, Waldman T (2004) PTEN gene targeting reveals a radiation-induced size checkpoint in human cancer cells. *Cancer Res* 64:6906–14. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1767
- Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123:758–62. doi: 10.1016/j.jaci.2009.02.011
- Lewis RS (2003) Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31:925–9. doi: 10.1042/
- Lewis RS, Cahalan MD (1989) Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells. *Cell Regul* 1:99–112.
- Lin Z, Fillmore GC, Um T-H, et al (2003) Comparative microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells. *Lab Invest* 83:765–76. doi: 10.1097/01.LAB.0000073130.58435.E5
- Lindahl T, Barnes DE (2000) Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65:127–133. doi: 10.1101/sqb.2000.65.127
- Liu S-Z (2006) Cancer control related to stimulation of immunity by low-dose radiation. *Dose Response* 5:39–47. doi: 10.2203/dose-response.06-108.Liu
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, et al (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 9:662–669. doi: 10.4161/cc.9.4.10764
- Lopreiato R, Giacomello M, Carafoli E (2014) The Plasma Membrane Calcium Pump: New Ways to Look at an Old Enzyme. *J Biol Chem* 289:10261–10268. doi: 10.1074/jbc.O114.555565
- Los M, Dröge W, Stricker K, et al (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol* 25:159–65. doi: 10.1002/eji.1830250127
- Luckey TD (2006) Radiation hormesis: the good, the bad, and the ugly. *Dose Response* 4:169–90. doi: 10.2203/dose-response.06-102.Luckey
-

- 
- Lukyanov KA, Belousov V V. (2014) Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochim Biophys Acta* 1840:745–56. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.030
- Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5:472–84. doi: 10.1038/nri1632
- MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC (2013) Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 31:259–83. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095956
- MacLennan I, Vinuesa C (2002) Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 17:235–8. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00398-9
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146:3–15. doi: 7856735
- Malek TR (2008) The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26:453–79. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357
- Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V (2008) Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)* 7:1765–71. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018
- Maréchal A, Zou L (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:1–17. doi: 10.1101/cshperspect.a012716
- Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (80- )* 316:1160–1166. doi: 10.1126/science.1140321
- Mazars C, Thuleau P, Lamotte O, Bourque S (2010) Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Mol Plant* 3:706–18. doi: 10.1093/mp/ssq024
- Meylan E, Tschopp J, Karin M (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442:39–44. doi: 10.1038/nature04946
- Mishina NM, Markvicheva KN, Bilan DS, et al (2013) Visualization of intracellular hydrogen peroxide with HyPer, a genetically encoded fluorescent probe, 1st edn. Copyright © 2013 Elsevier, Inc. All rights reserved.
- Moder A, Hufnagl C, Albrecht GL, et al (2010) Effect of combined Low-Dose Radon- and Hyperthermia Treatment (LDRnHT) of patients with ankylosing spondylitis on serum levels of cytokines and bone metabolism markers: a pilot study. *Int J Low Radiat* 7:423. doi: 10.1504/IJLR.2010.037663
- Monaco S, Jahraus B, Samstag Y, Bading H (2016) Nuclear calcium is required for human T cell activation. *J Cell Biol* 215:231–243. doi: 10.1083/jcb.201602001
- Montell C (2005) The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci Signal* 2005:re3-re3. doi: 10.1126/stke.2722005re3
- Muik M, Schindl R, Fahrner M, Romanin C (2012) Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> (CRAC) current, structure, and function. *Cell Mol Life Sci* 69:4163–4176. doi: 10.1007/s00018-012-1072-8
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway CA (2012) *Janeway's Immunobiology*, 8 th. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13. doi: 10.1042/BJ20081386
- Murray A (1994) Cell cycle checkpoints. *Curr Opin Cell Biol* 6:872–6. doi: 10.1007/s00192-

- Muslimović A, Nyström S, Gao Y, Hammarsten O (2009) Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PLoS One* 4:e5859. doi: 10.1371/journal.pone.0005859
- Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE (1997) Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 57:3963–71.
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11:823–36. doi: 10.1038/nri3084
- Nigg E (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17:471–480. doi: 10.1002/bies.950170603
- Parker DC (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11:331–60. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.001555
- Paulsen CE, Truong TH, Garcia FJ, et al (2011) Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity. *Nat Chem Biol* 8:57–64. doi: 10.1038/nchembio.736
- Pedersen PL, Carafoli E (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12:146–150. doi: 10.1016/0968-0004(87)90071-5
- Petrini JHJ, Stracker TH (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 13:458–62. doi: 10.1016/S0962-8924(03)00170-3
- Posakony JW, England JM, Attardi G (1977) Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol* 74:468–91. doi: 10.1083/jcb.74.2.468
- Pouget JP, Mather SJ (2001) General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur J Nucl Med* 28:541–61. doi: 10.1007/s002590100484
- Pulverkraft RJ, Wilson CW, Jayne H (1953) Effect on lymphocytes of ionizing radiation. *Nature* 171:1157–8.
- Rajewsky K (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751–8. doi: 10.1038/381751a0
- Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen J (2001) Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways. *J Cell Biol* 153:613–20. doi: 10.1083/jcb.153.3.613
- Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al (2006) Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med* 203:1259–71. doi: 10.1084/jem.20052494
- Reth M (2002) Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat Immunol* 3:1129–34. doi: 10.1038/ni1202-1129
- Roitt IM, Greaves MF, Torrigiani G, et al (1969) The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet (London, England)* 2:367–71. doi: 10.1016/S0140-6736(69)92712-3
- Rolink A, Melchers F (1991) Molecular and cellular origins of B lymphocyte diversity. *Cell* 66:1081–94. doi: 10.1016/0092-8674(91)90032-T
- Rosenbluth MJ, Lam WA, Fletcher DA (2006) Force microscopy of nonadherent cells: a comparison of leukemia cell deformability. *Biophys J* 90:2994–3003. doi:

---

10.1529/biophysj.105.067496

- Roth B, Gibhardt CS, Becker P, et al (2015) Low-dose photon irradiation alters cell differentiation via activation of hIK channels. *Pflugers Arch* 467:1835–49. doi: 10.1007/s00424-014-1601-4
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23:5706–15. doi: 10.1128/MCB.23.16.5706
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R (2010) From vaccines to memory and back. *Immunity* 33:451–63. doi: 10.1016/j.immuni.2010.10.008
- Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, et al (2009) T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 228:9–22. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00745.x
- Samanta K, Douglas S, Parekh AB (2014) Mitochondrial calcium uniporter MCU supports cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup>-dependent gene expression in response to receptor stimulation. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0101188
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *AnnuRevBiochem* 73:39–85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723
- Santivasi WL, Xia F (2014) Ionizing Radiation-Induced DNA Damage, Response, and Repair. *Antioxid Redox Signal* 21:251–259. doi: 10.1089/ars.2013.5668
- Schartner JM, Simonson WT, Wernimont SA, et al (2009) Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) expression in CD4+T cells impairs actin cytoskeletal organization during T cell/antigen-presenting cell interactions. *J Biol Chem* 284:34674–34681. doi: 10.1074/jbc.M109.024497
- Schieber M, Chandel NS (2014) ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol* 24:R453–R462. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034
- Schneider U, Schwenk H-U, Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621–626. doi: 10.1002/ijc.2910190505
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 Binding Protein 1 (53BP1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Biol* 151:1381–1390. doi: 10.1083/jcb.151.7.1381
- Schwartz RH (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305–34. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141110
- Shapiro-Shelef M, Calame K (2005) Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 5:230–42. doi: 10.1038/nri1572
- Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, et al (2006) Effect of combined spa-exercise therapy on circulating TGF-beta1 levels in patients with ankylosing spondylitis. *Wien Klin Wochenschr* 118:266–72. doi: 10.1007/s00508-006-0560-y
- Shibata A, Jeggo PA (2014) DNA Double-strand Break Repair in a Cellular Context. *Clin Oncol* 26:243–249. doi: 10.1016/j.clon.2014.02.004
- Sies H (2014) Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: Redox signaling and oxidative stress. *J Biol*



- 
- Chem 289:8735–8741. doi: 10.1074/jbc.R113.544635
- Sies H (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* 11:613–619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
- Simeoni L, Bogeski I (2015) Redox regulation of T-cell receptor signaling. *Biol Chem* 396:555–68. doi: 10.1515/hsz-2014-0312
- Siva S, MacManus MP, Martin RF, Martin OA (2015) Abscopal effects of radiation therapy: a clinical review for the radiobiologist. *Cancer Lett* 356:82–90. doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.018
- Slater AFG, Stefan C, Nobel I, et al (1995) Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82–83:149–153. doi: 10.1016/0378-4274(95)03474-9
- Smedler E, Uhlén P (2014) Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1840:964–969. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.11.015
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL (2012) STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:549–565. doi: 10.1038/nrm3414
- Sprent J, Tough D (1994) Lymphocyte life-span and memory. *Science* (80- ) 265:1395–1400. doi: 10.1126/science.8073282
- Syljuåsen RG, McBride WH (1999) Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in Jurkat T cells. *Radiat Res* 152:328–31. doi: 10.2307/3580333
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51:794–8.
- Teague TK, Munn L, Zygourakis K, McIntyre BW (1993) Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry* 14:772–82. doi: 10.1002/cyto.990140710
- Tobias CA, Blakely EA, Alpen EL, et al (1982) Molecular and cellular radiobiology of heavy ions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:2109–20. doi: 10.1016/0360-3016(82)90554-5
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, et al (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10:1343–1374. doi: 10.1089/ars.2007.1957
- Vaiserman AM (2010) Radiation Hormesis: Historical Perspective and Implications for Low-Dose Cancer Risk Assessment. *Dose-Response* 8:dose-response.0. doi: 10.2203/dose-response.09-037.Vaiserman
- van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2:196–206. doi: 10.1038/35056049
- Van Parijs L, Abbas AK (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280:243–8.
- Verstraeten S V, Mackenzie GG, Oteiza PI (2010) The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta* 1798:1739–49. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.06.010
- Ward JF (1995) Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat Res* 142:362–368. doi: 10.2307/3579145
- Ward JF, Blakely WF, Joner EI (1985) Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiat Res* 103:383–392. doi: 10.2307/3576760
-

- 
- Weydert CJ, Cullen JJ (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5:51–66. doi: 10.1038/nprot.2009.197
- Whiting CC, Su LL, Lin JT, Fathman CG (2011) GRAIL: a unique mediator of CD4 T-lymphocyte unresponsiveness. *FEBS J* 278:47–58. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07922.x
- Wolf IMA, Diercks B-P, Gattkowski E, et al (2015) Frontrunners of T cell activation: Initial, localized Ca<sup>2+</sup> signals mediated by NAADP and the type 1 ryanodine receptor. *Sci Signal* 8:ra102-ra102. doi: 10.1126/scisignal.aab0863
- Wu WS (2006) The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 25:695–705. doi: 10.1007/s10555-006-9037-8
- Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32:279–305. doi: 10.1016/S0143416002001847
- Xu T, Yue W, Li C-W, et al (2013) Microfluidics study of intracellular calcium response to mechanical stimulation on single suspension cells. *Lab Chip* 13:1060–9. doi: 10.1039/c3lc40880a
- Yamamori T, Yasui H, Yamazumi M, et al (2012) Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free Radic Biol Med* 53:260–270. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.033
- Yusuf I, Fruman DA (2003) Regulation of quiescence in lymphocytes. *Trends Immunol* 24:380–386. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00141-8

---

## Curriculum Vitae

---

04/2014 – heute:

### **Promotion[Biologie]**

- Fachbereich Biologie, AG Thiel, TU Darmstadt, Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg 1657)
- Thema: „Kurz- und Langzeiteffekte ionisierender Strahlung auf die T-Zelllinie Jurkat“

08/2011 – 08/2013

### **Master of Science Technische Biologie**

- Fachbereich Biologie, AG Thiel, TU Darmstadt
- Thema: „Calcium imaging mit den Calciumindikatoren Fluo-4 AM und YC3.60“

10/2008 – 05/2011

### **Bachelor of Science Biologie**

- Fachbereich Biologie, AG Löbrich, TU Darmstadt
- Thema: „Untersuchung von putativen Reparaturproteinen in G1- und G2-Zellen mittels RNA-Interferenz und Immunfluoreszenz“

10/2006 – 04/2008

### **Studium Luft- und Raumfahrttechnik**

- Fakultät für Maschinenwesen, TU München

## Schul Ausbildung

08/1997 – 03/2006

### **Allgemeine Hochschulreife**

- Gymnasium Kirn
- Leistungskurse Biologie, Erdkunde, Mathematik

---

## Wissenschaftliche Tätigkeit

- 04-08/2014      Vorlesung: Radiation Biophysics, TU Darmstadt
- 11-12/2014      Seminar: „Molecular radiation biology: from the basics to clinical applications“, Universitätsklinikum Frankfurt a. M.
- 09/2015          Publikation: Gibhardt CS, Roth B, Schroeder I, **Fuck S**, Becker P, Jakob B, Fournier C, Moroni A, Thiel G (2015) *X-ray irradiation activates  $K^+$  channels via  $H_2O_2$  signaling*, *Sci.Rep.* doi:10.1038/srep13861
- 27.02 – 02.03.2016    Posterpräsentation, Biophysical Society Annual Meeting 2016, Los Angeles, USA

---

## Danksagung

---

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Thiel für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte. Die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stete Unterstützung, Ermutigungen und den Freiraum beim Planen und Durchführen der Versuche war bereichernd.

Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die enge Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe danken.

Burkhard Jakob möchte ich für die Bereitstellung seines speziellen mikroskopischen Aufbaus danken und die rundum-sorglos-Betreuung während der Durchführung der Experimente.

Barbara Reinhards danke ich für die stete Hilfsbereitschaft, Fragen und Angelegenheiten außerhalb des Laboralltags zu klären.

Ein besonderer Dank gilt Silvia Haase, die mir bei so vielen Western Blots geholfen hat und nicht müde wurde, diese zu verbessern. Ein Dank gilt auch den TAs Mirja und Silvia Lenz, deren Arbeit im Hintergrund vieles im Labor erleichtert hat.

Der gesamten AG Thiel danke ich für eine super Arbeitsatmosphäre und einen sehr entspannten und freundschaftlichen Umgang miteinander. Im speziellen danke ich:

Pätrick für die gemeinsame Erarbeitung eines sehr komplexen Themas und den steten Wissensaustausch.

Kerri, Oli und Laura für die während dieser Zeit entstandenen Freundschaften.

Oli, Johannes und Elena für das Korrekturlesen.

Dem restlichen Kinderzimmer für die abwechslungsreichen Arbeitstage.